

**UNTERSUCHUNGEN ZU
AUSSCHIEDUNGSDAUER UND WIRKSAMKEIT
NACH DEM TROCKENSTELLEN VON KÜHEN
MIT EINEM
PENICILLIN - NEOMYCIN - PRÄPARAT**

BEATE SCHWING

1988

Disbui. München

1988





Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Hygiene und Technologie
der Lebensmittel tierischen Ursprungs
(Lehrstuhl: Prof. Dr. G. TERPLAN)
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

UNTERSUCHUNGEN ZU AUSSCHIEDUNGSDAUER UND WIRKSAMKEIT
NACH DEM TROCKENSTELLEN VON KÜHEN
MIT EINEM PENICILLIN-NEOMYCIN-PRÄPARAT

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der
tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Beate Schwing
aus Seelbach

München 1988

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: Prof. Dr. G. Terplan

Korreferent: Priv. Doz. Dr. Dr. habil. W. Rambeck

Tag der Promotion: 26. Februar 1988

MEINEN ELTERN

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1 Einleitung	1
2 Schrifttum	
2.1 Mikrobiologische Verfahren	2
2.1.1 Agardiffusions- und Plattenverfahren	2
2.1.1.1 Blättchen- und Lochtest	2
2.1.1.2 Zylindertestverfahren	4
2.1.2 Verfahren mit Redox-Indikatoren	4
2.1.2.1 Brillantschwarz-Reduktionstest (BRT)	4
2.1.2.2 Streifentest	5
2.1.3 Verfahren mit Bestimmung der Säurebildung	6
2.1.3.1 Säuerungstest mit <i>Bacillus</i> (B.) stearothermophilus	6
2.1.3.2 Säuerungstest mit <i>Streptococcus</i> (S.) thermophilus	7
2.1.3.3 Säuerungstest mit Joghurt- und Säureweckerkulturen	7
2.1.4 Mikrobieller Rezeptortest	8
2.1.5 Biolumineszenz	11
2.2 Immunologische Verfahren	15
2.2.1 Enzym-Immuno-Assay (EIA)	15
2.2.2 Radio-Immuno-Assay (RIA)	17
2.2.3 Latex-Agglutinationstest	19
2.3 Physikalisch-chemische Verfahren	20
2.3.1 Chromatographie	20
2.3.1.1 Dünnschichtchromatographie	20
2.3.1.2 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)	24
2.3.1.3 Gaschromatographie	27

	Seite
2.3.2	Massenspektrometrie 30
2.3.3	Elektrophorese 32
2.3.4	Laser- Streuung 34
2.3.5	Spektroskopische Verfahren 35
2.4	Biochemische Verfahren 36
3	Eigene Untersuchungen 39
3.1	Material 39
3.1.1	Versuchstiere 39
3.1.2	Trockensteller 41
3.2	Methodik 44
3.2.1	Entnahme der Milchproben 44
3.2.2	Applikation des Trockenstellers 44
3.2.3	Nachweis von Hemmstoffen 45
3.2.3.1	Agardiffusionstest 45
3.2.3.2	Brillantschwarz-Reduktionstest (BRT) 51
3.2.4	Bakteriologische Untersuchungen 51
3.2.5	Zytologische Untersuchungen 54
3.2.5.1	California-Mastitis-Test (CMT) 54
3.2.5.2	Mikroskopische Untersuchungen 55
3.3	Ergebnisse 57
3.3.1	Untersuchungen auf Hemmstoffe 58
3.3.1.1	Vor dem Trockenstellen 58
3.3.1.2	Nach dem Kalben 58
3.3.2	Untersuchungen auf Eutergesundheit 63
3.3.2.1	Vor dem Trockenstellen 65
3.3.2.2	Nach dem Kalben 69
4	Besprechung der Ergebnisse und Diskussion 74
5	Zusammenfassung 86
6	Literaturverzeichnis 88

1 Einleitung

Das vorsorgliche Trockenstellen auch eutergesunder Kühe unter Antibiotikaschutz ist eine weiterverbreitete Maßnahme zur Mastitisbekämpfung. Damit können subklinische Mastitiden ausgeheilt und Neuinfektionen während der Trockenperiode weitgehend vermieden werden. Für die Abgabe der Milch nach dem Kalben wurden Wartezeiten festgelegt, um Antibiotikarückstände in der verkehrsfähigen Milch zu verhindern.

In den letzten Jahren wurden mehrfach Fälle bekannt, in denen auch nach Einhaltung der Wartezeit Rückstände in der Milch gefunden wurden.

Mir wurde die Aufgabe zugewiesen, mit den beschriebenen Untersuchungen zu prüfen, ob es nach dem Trockenstellen mit einem Penicillin-Neomycin-Präparat zu einer Ausscheidung von Antibiotikarückständen nach dem Kalben kommt. Gleichzeitig wurde die Wirksamkeit des Kombinationspräparates überprüft. Mit dem Literaturteil sollte eine Übersicht der verschiedenen Nachweisverfahren für Antibiotika und in der Mastitistherapie eingesetzte Chemotherapeutika vermittelt werden. Die übrigen mit der Anwendung von Trockenstellpräparaten bestehenden Fragestellungen in der Literatur (Rückstandsproblematik, Pharmakokinetik etc.) sollten bewußt unberücksichtigt bleiben, da sie bereits in anderen Arbeiten des Institutes behandelt worden sind (FEUERSTEIN, 1987; NEUMANN-PAULITSCHKE 1987).

2. SCHRIFTTUM

2.1 Mikrobiologische Verfahren

Zum Nachweis von Hemmstoffen in der Milch werden überwiegend mikrobiologische Methoden eingesetzt. Diese Verfahren beruhen auf der Empfindlichkeit von Testmikroorganismen gegenüber Hemmstoffen. Die Wachstums-
hemmung der Testmikroorganismen kann durch verschiedene Nachweise erfolgen: Sichtbares Keimwachstum (Agardiffusions- und Plattenverfahren), Verfahren mit Redox-Indikatoren, Verfahren mit Bestimmung der Säurebildung und Biolumineszenz. Eine Differenzierung der Hemmsubstanzen ist dabei nur bedingt möglich. Eine Übersicht der verschiedenen Nachweisverfahren für Penicillin, Tetracycline und Streptomycin wird in Tabelle 1 wiedergegeben.

2.1.1. Agardiffusions- und Plattenverfahren

Die festen Nährböden werden bei dieser Methode mit Testmikroorganismen beimpft, durch deren Wachstum es zur Ausbildung multipler Mikrokolonien und somit zu einer Trübung des Mediums kommt. Bei Anwesenheit von Hemmstoffen bleibt der Nährboden in Bereichen, die gegen den Testkeim wirksame Konzentrationen enthalten, wegen Hemmung des Keimwachstums klar.

2.1.1.1 Blättchen- und Lochtest

Bei dem "Blättchentest" werden Papierscheibchen, die eine bestimmte Menge Milch aufsaugen, in die zu untersuchende Probe eingetaucht und auf den Agar gelegt, während beim

"Lochtest" definierte Mengen der Milchproben in vorher in den Agar gestanzte Löcher einpipettiert werden. Für diese Methoden gibt es verschiedene nationale und internationale Standards.

a) *Bacillus* (B.) *subtilis* (ATCC 6633)

Beim Blättchen- oder Lochtest mit *B. subtilis* als Testkeim (MESSER et al., 1978) werden die Petrischalen mit jeweils 6 ml Agar, der 10^6 *B. subtilis*-Sporen/ml enthält, beschickt. Die Inkubationszeit der Platten beträgt 14-25 Stunden bei 32°C oder 5-7 Stunden bei 37°C. Die Platten sind auch als Fertigtest im Handel erhältlich (Difco).

b) *Bacillus* (B.) *stearothermophilus*

Dieser thermophile Testkeim reagiert auf Penicillin empfindlicher als *B. subtilis*. Mit dem Verfahren, das von IGARASHI et al. (1960, 1961) beschrieben wurde, konnten nach 90 Minuten Inkubationsdauer bei 65°C bzw. 75 Minuten bei 62°C, 0,005 I.E. Penicillin/ml nachgewiesen werden. Vor dem Ansetzen wurden die Milchproben erhitzt. Da für die Herstellung der Sporensuspension sterile Luft benötigt wurde, war das Verfahren relativ aufwendig. GALESLOOT und HASSING (1962) vereinfachten die Methode, die dann in dieser Form von der International Dairy Federation (IDF, 1970) als Standardverfahren aufgenommen wurde: Die Platten werden 2,5 - 5 Stunden bei 55°C inkubiert. Die Nachweisgrenze liegt bei 0,0025 I.E. Penicillin/ml. Der Nachteil des Verfahrens liegt darin, daß für die Plattenherstellung immer frische Testkulturen benötigt werden. Eine Modifikation dieses Verfahrens mit einem pH-Indikator (Bromkresolpurpur) im Testmedium wird als Fertigtest vermarktet (Difco).



Die Inkubationszeit bei diesen handelsfertigen Platten beträgt 16 Minuten bei 65° C bzw. 21 Minuten bei 56° C. Bei Penicillinkonzentrationen über 0,002-0,003 I.E./ml bleibt die Indikatorfarbe unter dem Blättchen purpur; bei solchen über 0,005 I.E./ml kann die Wachstums hemmung der Keime direkt wahrgenommen werden. Diese Methode ist mit dem Stamm *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* C 953 als Referenzverfahren bzw. Routineverfahren gemäß § 35 LMBG für die Bundesrepublik Deutschland festgelegt worden (BGA, 1980).

2.1.1.2 Zylindertestverfahren

Bei dieser Nachweismethode (GROVE und RANDALL, 1955; MESSER et al., 1978; AOAC-METHODS, 1980) werden rostfreie Stahlzylinder auf die Agar-Keimgemisch-Oberfläche aufgelegt, in die die Milchproben einpipettiert werden. Die Milch diffundiert in den Agar und eventuell vorhandene Hemmstoffe verhindern im wirksamen Konzentrationsbereich das Wachstum des Testkeims. Die Platten werden bei 30° C 16-18 Stunden inkubiert. Das Verfahren ist auch zur quantitativen Bestimmung von Penicillin geeignet. Die Nachweisgrenze liegt bei 0,0125 I.E./ml. 1985 wurde der Test von der International Dairy Federation als Standardverfahren zum Hemmstoffnachweis aufgenommen.

2.1.2 Verfahren mit Redox-Indikatoren

2.1.2.1 Brillantschwarz-Reduktionstest (BRT)

Dieses Testverfahren mit *B. stearothermophilus* als Testkeim wurde von KRAACK und TOLLE (1967, 1969) entwickelt und als Routineverfahren in die amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG aufgenommen (BGA, 1980). Bei dieser

Methode wird die unerhitzte Milch nach dem Aufbringen auf das indikatorhaltige Nährboden-Keimgemisch und einer einstündigen Diffusionszeit bei 4° C mit Aqua dest. abgespült und anschließend für ca. 2,5 Stunden bei 60-70° C inkubiert. Bei Anwesenheit von Hemmstoffen unterbleibt das Wachstum der Keime und damit die Reduktion des Indikators Brillantschwarz, die Farbe des Agars bleibt dunkelblau. Die Empfindlichkeit des Testes hängt vom zugegebenen Milchvolumen ab und liegt bei 0,008 I.E. Penicillin/ml. Bei Verwendung des Testes im Mikrotiterplattensystem können auch umfangreiche Reihenuntersuchungen relativ einfach durchgeführt werden. Die Platten werden dabei nach dem Abgießen der Milch mit einer Alufolie verschlossen und im Wasserbad inkubiert.

2.1.2.2 Streifentest

WALSER (1984) beschreibt den Hemmstoffnachweis in der Milch mit Hilfe eines Streifentests. Es handelt sich dabei um den Micur BT (Boehringer), der ursprünglich für den Nachweis antibakterieller Stoffe im Urin konzipiert war (KALTWASSER et al., 1983; BODE et al., 1983). Der Streifentest enthält in einem Testfeld Sporen von *B. subtilis* (ATCC 6051), sowie einen Nährkarton mit dem Farbindikator 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC). Nach Befeuchtung des Testfeldes mit hemmstofffreier Milch vermehrt sich während der Bebrütung *B. subtilis* und reduziert das farblose TTC zu dem roten Formazan; das weiße Testfeld färbt sich gleichmäßig rosa bis rot. Bei Anwesenheit von antibakteriellen Substanzen in der Milch wird dagegen das Wachstum der Keime unterdrückt, das Testfeld bleibt unverändert weiß. Bei Ausschluß von Feuchtigkeit ist dieses System über Monate hinweg haltbar. Als Nachweisgrenzen wurde für Penicillin 0,016 µg/ml (das entspricht 0,027 I.E./ml), für Neomycin 32 µg/ml und für Chloramphenicol 16 µg/ml ermittelt

(WALSER, 1984). Durch extrem starke Kontamination der Milch, z.B. mit *E. coli* bei unsauberer Probeentnahme, kann der Test gestört werden, was jedoch durch Erhitzen der Milch vor dem Testansatz ausgeschlossen werden kann.

2.1.3 Verfahren mit Bestimmung der Säurebildung

2.1.3.1 Säuerungstest mit *B. stearothermophilus*

Unter der Bezeichnung "Delvotest" wird dieses Testverfahren, das 1975 von VAN OS et al. beschrieben wurde, von Gist-Brocades im Handel vertrieben. Ein Röhrchen, das 0,3 ml festes Medium mit 10^6 *B. stearothermophilus*-Sporen/ml enthält, wird mit einer Tablette, die aus Nährstoffen und dem ph-Indikator Bromkresolpurpur besteht, beschickt (Delvotest P). Nachdem die zu untersuchende unerhitzte Milchmenge einpipettiert und das Röhrchen bei 63-66° C für 2,5 Stunden inkubiert wurde, kann das Ergebnis anhand der Farbreaktion abgelesen werden. Bei hemmstoffhaltiger Milch, d.h. wenn die Probe mehr als 0,006 I.E. Penicillin/ml beinhaltet, bleibt die Farbe der Probe purpur, während ein Umschlagen der Farbe nach gelb ein negatives Ergebnis bzw. Penicillinkonzentrationen unter 0,002 I.E./ml anzeigt. Als zweifelhaft wird gewertet, wenn das Medium nur teilweise nach gelb umschlägt (z.B. bei Penicillinkonzentrationen zwischen 0,002 und 0,006 I.E./ml). Die Haltbarkeit der Röhrchen beträgt bis zu 12, die der Nährstofftabletten bis zu 6 Monaten. Für Reihenuntersuchungen gibt es eine Variation dieser Testform in Form von Mikrotiterplatten, in deren Vertiefungen 0,15 ml Agar enthalten sind (Delvotest P multi). Für den Nachweis von Sulfonamiden wurde der "Delvotest

Sulpha" entwickelt, der zur Erhöhung der Empfindlichkeit gegenüber diesen Chemotherapeutika Trimethoprim enthält. OLIVER et al. (1984) stellten fest, daß der "Delvotest" bei Untersuchungen über Rückstände im Kolostrum nach antibiotischem Trockenstellen in 5 Fällen positive Testergebnisse erbrachte, während die Proben im Agardiffusionsverfahren mit *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* negativ ausfielen. Die Autoren nahmen deshalb an, daß es sich um falsch-positive Ergebnisse im "Delvotest" handelte, die eventuell durch originäre Hemmstoffe bedingt sein könnten. Ebenfalls falsch-positive Ergebnisse erhielten MACAULY und PACKARD (1981) in 11 % der von ihnen untersuchten Milchproben.

2.1.3.2 Säuerungstest mit *Streptococcus* (S.) *thermophilus*

Dieser auch als "Accusphere Methode" (IDF 1986) bezeichnete Test wird als fertiges Testkit als "Intertest" (Intervet) bzw. als "AIM-Test" (Antibiotics in milk) (Oxoid) vertrieben. Beide Kits enthalten eine gefriergetrocknete *S. thermophilus*-Kultur und den Indikator Bromkresolpurpur zur Anzeige von pH-Änderungen. Vor dem Ansetzen müssen die Milchproben auf 95° C erhitzt werden, um evtl. vorhandene Keime abzutöten, bzw. originäre Hemmstoffe zu inaktivieren. Nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden bei 45° C kann das Ergebnis abgelesen werden. Bei hemmstoffhaltiger Milch bleibt die Farbe der Röhrchen unverändert blau. Die Nachweisgrenze der beiden Tests ist nahezu gleich und liegt bei 0.01 I.E. Penicillin/ml (JACOBS et al., 1972 b; HAVERBECK, 1983; IDF, 1986).

2.1.3.3 Säuerungstest mit Joghurt- und Säureweckerkulturen

Bei diesen Verfahren werden die Milchproben mit Joghurt- oder Säureweckerkulturen nach Erhitzung beimpft, bebrütet

und meist anhand von Indikatoren die Säuerung beurteilt. Als Vergleich dient ein Parallelansatz mit hemmstofffreier Milch. FRANK (1965) entwickelte ein Verfahren, bei dem die Milchprobe nach Erhitzen mit Joghurtkultur, Methylenblau und einem Wachsfaktor für *S. thermophilus* versetzt und 100 Minuten lang bebrütet werden. Die Reduktionszeit des Methylenblaus wird als Maß für eventuell in der Milch vorhandene Hemmstoffe gewertet. Die Nachweisgrenze für Penicillin liegt bei 0,03 I.E./ml. COGAN und FITZGERALD (1980) verwendeten zur quantitativen Penicillinbestimmung ebenfalls *S. thermophilus*, die Nachweisgrenze lag bei 0,001-0,002 I.E./ml. Durch die genaue Einhaltung der Inkubationszeit (2 Stunden bei 45° C) und zweimalige Titration der Probe war dieses Verfahren relativ aufwendig. Deshalb wurde zum Nachweis der entstehenden Säure der pH-Indikator Bromkresolpurpur zugesetzt, der sich in Vorversuchen gegenüber dem Redox-Indikator Triphenyltrazolium als empfindlicher erwiesen hatte. In dieser einfacheren Testform erhöhte sich die Nachweisgrenze auf 0,007 I.E./ml (qualitativer Test). Bei HAMANN et al. (1975 c, 1980) werden die Proben nach Zugabe von Joghurtkulturen bei 37° C 45 Minuten lang bebrütet. Die Ergebnisse liegen innerhalb von 60 Minuten vor. Die Nachweisgrenzen betragen für Penicillin 0,01 I.E./ml, für Streptomycin 0,05 µg/ml und für Chloramphenicol 0,1 µg/ml. Durch einfache Messung der Gerinnungszeit oder mikroskopische Untersuchung von Färbepräparaten der betreffenden Joghurtkulturen können ebenfalls Rückschlüsse auf die Anwesenheit von Hemmstoffen gezogen werden (LIMMER, 1969).

2.1.4 Mikrobieller Rezeptortest

CHARM (1979) entwickelte einen hochempfindlichen Test zum Nachweis von Penicillin in der Milch, der in nur 15 bzw. 20 Minuten durchgeführt werden kann. Dazu werden die Milch-

proben mit Bakterienzellen, die an der Oberfläche Rezeptorstellen für Penicillinmoleküle besitzen und einer definierten Menge radioaktiv (^{14}C) markierten Benzylpenicillin zugegeben und die Ansätze 3 Minuten bei 90°C bebrütet. Als Bakterien eignen sich Zellen von *Bac. stearothermophilus* var. *calidolactis* (ATCC 10149), da sie gegen Penicillin sehr empfindlich sind und hohen Temperaturen widerstehen können. Die radioaktiv markierten Penicillinmoleküle konkurrieren mit den eventuell in der Probe vorhandenen Penicillinmolekülen um die Rezeptorplätze an den Bakterien. Nach der Inkubationszeit werden die Zellen durch Zentrifugieren abgetrennt, in Phosphatpuffer gewaschen und die Radioaktivität mit einem Szintillationszähler bestimmt. Der Betrag des ^{14}C -markierten Benzylpenicillins, welches von den Zellen aufgenommen wurde, ist umgekehrt proportional zu der ursprünglich anwesenden Konzentration in der Milchprobe. Für diesen sogenannten "Charm-Test" gibt es zwei Anwendungsmöglichkeiten. Als Reihenuntersuchungsverfahren wird die Penicillinkonzentration im Vergleich mit einer Referenzkonzentration gemessen. Das Verfahren dauert 15 Minuten, die Nachweisgrenze liegt bei 0,005 I.E. Penicillin/ml. Mit der quantitativen Bestimmung kann Penicillin in Konzentrationen bis zu 0,00125 I.E./ml in 20 Minuten nachgewiesen werden. Der "Charm-Test" wird auch im fertigen Testkit vertrieben (DT.MOLKEREIZEITUNG, 1979; DT.MILCHWIRTSCHAFT, 1979). Dieses Testprinzip kann auch zum Nachweis von anderen Antibiotika verwendet werden, u.a. für Streptomycin (CHARM, 1979). CHARM und CHI (1982) überprüften in einer vergleichenden Studie den Reihenversuch zum Nachweis von Penicillin/ml der Milch. Dabei wurden 10 Nullproben und 10 Proben, denen 0,01 I.E. Penicillin/ml zugesetzt wurden, kodiert und von 11 verschiedenen Laboratorien untersucht. In Abhängigkeit von der Wahl der statistischen Parameter wurden die Konzentrationen mit einem Vertrauenswert von $\geq 95\%$ richtig bestimmt.

THOROGOOD und PRENTICE (1982) und THOROGOOD et al. (1983) untersuchten und bewerteten den Charm-Test für den Nachweis von Penicillin in Rohmilch und rekonstituierter Magermilch. Das Verfahren wurde mit dem Bromkresolpurpur-Test (sowohl Accusphere-Methode als auch AIM-Test) verglichen. Den Roh- und Magermilchproben wurden Penicillin-Konzentrationen von 0,0 I.E., 0,015 I.E., 0,020 I.E. und 0,025 I.E. /ml zugesetzt. Es wurden jeweils 8-fache Ansätze untersucht. Für beide, Roh- und Magermilchproben, zeigte der Charm-Test eine Fehlerquote von 15,6 %, während im Bromkresolpurpur-Test (in beiden untersuchten Verfahren) eine Genauigkeit von 100 % erreicht wurde. THOROGOOD et al. (1983) sehen in der kurzen Analysendauer des Charm-Tests den Hauptvorteil dieses Verfahrens. Infolge der hohen Fehlerquote ist jedoch ein einziger Probenansatz für das Reihenuntersuchungsverfahren nicht ausreichend. Von den Autoren wird deshalb empfohlen, mehrere Proben zu testen und entsprechend den Ergebnissen den Test zu wiederholen. In dem von der Expertengruppe (E 47) des IDF (1986) beschriebenen Charm-Test II werden außer β -Laktam-Antibiotika auch Tetracycline, Aminoglykoside, Macrolide, Lincomycin, Chloramphenicol, Novobiocin und Sulfonamide in Milch und Milchprodukten bestimmt. Zur radioaktiven Markierung der verschiedenen Antibiotika dienen entweder ^{14}C oder ^3H . HEESCHEN und SUHREN (1986) und SUHREN und HEESCHEN (1987 a) modifizierten den Charm-Test II hinsichtlich der Inkubationsbedingungen und der Art einiger Reagenzien. Zur Auswertung der Ergebnisse wird ein Kontrollpunkt festgelegt (SUHREN und HEESCHEN, 1987 b). Dazu wird von dem Zählwert der Negativprobe ein bestimmter Prozentsatz, der für die einzelnen Antibiotika unterschiedlich ist, subtrahiert. Meßwerte unterhalb dieses Kontrollpunktes lassen

auf das Vorhandensein des untersuchten Antibiotikums in der Probe schließen. Der Nachweis von Tetracyclin und Sulfonamiden wird wegen unspezifischer Einflüsse auf die Zählwerte noch als problematisch beurteilt.

2.1. 5 Biolumineszenz

Unter Biolumineszenz versteht man im allgemeinen das Selbstleuchten von Lebewesen, wobei die Aussendung der Lichtquanten durch eine vorausgehende enzymatisch gesteuerte chemische Reaktion zustande kommt.

WESTHOFF und ENGLER (1975) beschrieben eine Methode zum Nachweis von Penicillin in der Milch, bei welcher der Nachweis auf der Detektion des ATP, das durchschnittlich in einer Menge von 10^{-15} g/ Bakterienzelle enthalten ist, beruht. Die Autoren mischten fettfreie, antibiotikahaltige Milchproben mit einer *B. subtilis* (ATCC 6633)- Sporen enthaltenden Bouillon und bebrüteten die Ansätze 2 bzw. 3 Stunden bei 37° C . Zum quantitativen Nachweis des ATP und damit des Keimwachstums wurde das Biolumineszenzsystem des Leuchtkäfers (*Photinus pyralis*) verwendet. Dabei müssen zum Reaktionseintritt neben dem Luziferin-Luziferase-System auch Magnesium, ATP und Sauerstoff vorliegen, wobei das Enzym Luziferase die Oxidation des Luziferins katalysiert. Für jedes ATP-Molekül, das bei dieser Reaktion dephosphoryliert wird, wird ein Photon freigesetzt. Bei Verwendung von 1 % Sporensuspension in der Bouillon konnten nach 2-stündiger Inkubation Proben mit 0,025 I.E. Penicillin /ml zu 100 % von penicillinfreien Kontrollproben unterschieden werden, entsprechend bei einer 5 % Sporensuspension nach 35 Stunden 0,015 I.E. Penicillin /ml .

WILLIAMS (1984) wies ebenfalls mit dem Biolumineszenzverfahren Antibiotika in der Milch nach. Die Proben wur-

den alle 30 Minuten auf ihren ATP-Gehalt untersucht. Bei Konzentrationen von 0,01 I.E. oder weniger Penicillin /ml erfolgte eine starke Zunahme der Photonenemission, während bei Konzentrationen über 0,025 I.E. /ml die Lumineszenz nach 2 Stunden unter den Ausgangswert sank.

Tabelle 1: Mikrobiologische Nachweismethoden für Penicillin, Tetracycline
und Streptomycin in der Milch (in Anlehnung an CORRY et al., 1983)

<u>Detektions- prinzip</u>	<u>Testkeim</u>	<u>Inkubations- bedingungen</u> Zeit in Std.	<u>Nachweisgrenzen /ml</u> Peni- Chlor- Strep- cil- tetra- to- lin cyclin mycin I.E. µg	<u>Quellen</u>
sichtbares <u>Kelnwachstum</u>				
Blättchentest	B. subtilis ATCC 6633	2,5 - 3	0,05	MESSER et al. (1978)
	B. stearo- thermoph. v. calidol.	2,5 - 5	0.0025	GALESLOOT und HASSING (1962) IDF (1970) § 35 LMBG: Amtl. Metho- de
Zylinderplat- tenverfahren	S. lutea ATCC 9341	18 30	0,0125	GROVE und RANDALL (1955)
	B. stearo- thermoph. v. calidol.	4,5 64	0,002	VILIM et al. (1979)

Fortsetzung Tabelle 1

Redox-Potential

BRT (Brilliant-schwarz-reduktionstest)	B. stearothermoph. v. calidol.	2-2,5	55	0,006	0,8	8	KRAACK u. TOLLIE (1961, 1962)
Streifen-test mit Triphenyl-tetrazolium-chlorid	B. subtilis ATCC 6051	16-20	35-37	0,027	8	640	WALSER (1984)

Säurebildung

mit Bromkresol-purpur	B. stearothermoph. v. calidol.	1,5 bzw. 2,5	63-66	0,006	0,4	13	Di-hydro-strept. VAN OS et al. (1975)
S. thermophilus Y1		< 2	45	0,007	1,0	25	COGAN u. FITZGERALD (1980)
S. thermophilus		4	45	0,008-0,01	0,02-0,5	1,0-8,0	JACOBS et al. (1972) HAVERBECK (1983) IDF (1986)
Laktatbestimmung bzw. pH-Messung	Joghurtbakterien	30-60 Min.	37	0,01	0,05	0,05	HAMANN et al. (1980)

1
14
1

2.2 Immunologische Verfahren

Sie beruhen im allgemeinen auf einem kompetitiven Prinzip, bei dem das gesuchte Antibiotikum (Hapten) mit dem gleichen und mit einer nachweisbaren Substanz (Enzym, Radioisotop u.a.) markierten Antibiotikum um die Bindungsstellen eines spezifischen Antikörpers konkurriert. Durch den Nachweis des Markers kann das Verfahren sehr spezifisch und genau sein. Weitere Vorteile sind die schnelle und einfache Durchführung der Verfahren, wobei eine komplizierte Aufbereitung des Probenmaterials meist nicht erforderlich ist. Voraussetzung ist die Herstellung eines Antikörpers, wobei die Antibiotika als Haptene zur Immunisierung von Serumspendern an einen Proteinträger gekoppelt werden müssen, um immunogen zu sein.

2.2.1 Enzym-Immuno-Assay (EIA)

BROWN et al. (1980) und BROWN (1981) beschrieben einen Enzym-Immuno-Assay für die quantitative Bestimmung von Antibiotika in der Milch. Für die Entwicklung des Tests wurde Penicillin als nachzuweisendes Antibiotikum gewählt. In Röhrchen, die den Antikörper als Festkörperphase enthalten, wird zusammen mit der zu untersuchenden Milchprobe Peroxidase-gekoppeltes Penicillin eingefüllt. Eventuell in der Probe vorhandenes unmarkiertes Penicillin konkurriert mit dem enzymgebundenen Penicillin um Bindungsstellen an Antikörpern. Diese werden ihrem Mengenverhältnis entsprechend besetzt. Die nach einem Waschschrift zugegebene Substratlösung (m-Phenylendiamin und H_2O_2) wird in Abhängigkeit von der gebundenen Menge an Penicillin- Peroxidase-Konjugat umgesetzt. Die Änderung der Farbintensität der Lösung im Vergleich zu Ansätzen mit bekannten Konzentrationen dient als Maß für die Enzymaktivität und ist umgekehrt proportional zu dem in der Milch vorliegenden freien Penicillin. Die Ergebnisse sind visuell

oder mit Hilfe eines Spektrometers ablesbar. Es konnten Konzentrationsunterschiede im Bereich von $0,1-0,001$ I.E./ml bestimmt werden. Für die Routineuntersuchung wird der visuelle Vergleich mit einer Referenzkonzentration für ausreichend angesehen. MIURA et al.(1981) beschreiben die Anwendung des von KITAGAWA et al.(1978) entwickelten Immuno-Assays für den Ampicillinnachweis in der Milch. β -D-Galaktosidase-markiertes Ampicillin konkurriert dabei mit dem zu bestimmenden (unmarkierten) Ampicillin um die Antikörperbindungsstellen aus dem Anti-Ampicillinserum vom Kaninchen. Nach dreistündiger Inkubation bei 25°C wird Ziegen-Anti-Kaninchen-Serum zugegeben und das Gemisch über Nacht bei 25°C inkubiert. Durch fluorimetrische Messung wird die umgesetzte Menge des Substrats (7- β -D-Galakto-Pyranosyloxy-4-methylcumarin) gemessen und dadurch die Enzymaktivität in einem durch Zentrifugieren gewonnenen Präzipitat (Antigen-Antikörper-Komplex) bestimmt. Die Nachweisgrenze für Ampicillin liegt bei $0,01\text{ }\mu\text{g/ml}$ Milch. Zur Untersuchung pharmakokinetischer Charakteristika von Benzylpenicillin und seinen Benzylpenicilloyl (BPO) - Derivaten in Serum und Milch verwendeten ROHNER et al.(1985) einen kompetitiven ELISA, wobei an Mikrotiter-Platten gebundenes Anti-BPO-HSA (Human Serum Albumin)-Antiserum als Immunosorbens dient. BPO-Phosphatase, als enzymmarkiertes Antigen, und das zu bestimmende BPO konkurrieren um die Bindungsstellen am Antikörper. Eine Stunde nach Zugabe des Substrats Nitrophenyl-Phosphat wird die Absorption bei 405 nm gemessen und mit Standardkurven verglichen. Die Nachweisgrenze liegt bei $0,001\text{ }\mu\text{g/ml}$. MÄRTLBAUER und TERPLAN (1987) entwickelten zum Nachweis von Chloramphenicol (CAP) in Milch einen heterologen Enzym-Immuno-Assay. Als Enzymkonjugat dient Peroxidase-markiertes CAP- Monosuccinat. Nach Beschichten der Platten mit Anti-Kaninchen-IgG, Absättigen mit fetalem Kälberserum und dreimaligem Waschen werden Standardlösungen und Proben

in die Platte pipettiert. Anschließend wird in jede Kavität Peroxidase-markiertes CAP sowie Anti-CAP-Serum gegeben. Nach einer Inkubation von 18 Stunden bei 4° C wird die Platte gewaschen und ausgeschlagen. Dann wird Enzymsubstrat (Tetramethylbenzidin in Kaliumcitrat-Puffer) zugegeben, nach ausreichender Farbentwicklung die Reaktion mit 0,1 ml H₂SO₄ (1 mol/l) gestoppt und die Extinktion bei 450 nm gemessen. Die Nachweisgrenze für dieses Verfahren liegt bei 0,0005 µg/ml, wobei die Wiederfindungsrate für CAP-Gehalte zwischen 0,0005-0,009 µg/ml bei 100 % liegen.

2.2.2 Radio-Immuno-Assay (RIA)

Bei dieser Analysentechnik werden hohe Spezifität und Empfindlichkeit, kombiniert mit der Möglichkeit eines großen Probendurchsatzes im Rückstandsnachweis erreicht. Der Reaktionsansatz eines RIA besteht aus drei Komponenten: Antigen, Antikörper und Radioligand (radioaktiv markiertes Antigen).

Das Penicillin-Nachweisverfahren, das 1981 von WAL und BORIES beschrieben wurde, basiert auf einer quantitativen Überführung des Penicillins in der Milch in Penicilloyl, durch Aufspaltung des β -Laktam-Ringes der Penicillinmoleküle. Bei alkalischem pH-Wert werden die Penicilloylgruppen an Aminocapronsäure kovalent gebunden. Ein Anti-Penicilloyl-Kaninchen-Serum wird mit einer definierten Menge radioaktiv markierten Antigens (¹²⁵J-BSA-Penicilloyl-Konjugat) und mit dem in der Milchprobe zu bestimmenden Antigen (Penicilloyl) über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird Anti-Kaninchen-Serum vom Schaf zugegeben, wodurch der markierte Antikörper-¹²⁵J-BSA-Penicilloyl-Komplex vollständig ausfällt und die

Radioaktivität des Rückstandes mit einem Gamma-Szintillationsspektrometer bestimmt. Die Quantifizierung erfolgt anhand einer Eichkurve. Dank der Spezifität der Antikörper erlaubt das Verfahren eine zuverlässige Bestimmung von Penicillin in biologischen Flüssigkeiten (Serum, Milch, Urin), auch in Gegenwart anderer Antibiotika, bis zu einer Nachweisgrenze von $0,01 \mu\text{g/ml}$. 1984 entwickelten ARNOLD et al. ein Verfahren zur selektiven Bestimmung von CAP und -metaboliten, die sich nur in der Acyl-Seitenkette von der Muttersubstanz unterscheiden. Zur Extraktion wurde der entfetteten Milch ein Chloroform-Isooctan-Gemisch (3:2) zugegeben. Nach dem Zentrifugieren konnte die wäßrige Phase für die Reaktionsansätze, die zur Einstellung auf geeignete CAP-Konzentrationen mit Pufferlösungen verdünnt wurden, verwendet werden. Das Antiserum wurde von Schafen gewonnen, die mit an ein Trägerprotein gekoppelten CAP immunisiert worden waren. Die kompetitive Reaktion zwischen unmarkiertem CAP aus der Probelösung, ^3H -markiertem CAP und dem Antiserum erfolgte während der Inkubation bei 0°C über Nacht. Nach Behandlung mit Aktivkohle und Zentrifugieren wurde die Radioaktivität des Überstandes im Szintillationszähler bestimmt. Die Nachweisgrenze lag bei $1 \mu\text{g/ml}$ Milch. Probenextrakte aus Muskulatur, Milch und Eiern brachten gleiche Ergebnisse wie wäßrige Standardlösungen. Mit Hilfe einer gaschromatographischen Methode wurden die Rückstandsdaten bestätigt. Allerdings zeigte sich als vorläufiges Resultat von Behandlungsversuchen mit Milchkühen, daß abhängig vom Weg der Applikation und der Absetzfrist vermutlich Metaboliten auftreten, die zu Diskrepanzen zwischen RIA und Gaschromatographie führten. Bei Milchproben, die keine größeren Konzentrationen an kreuzreagierenden Metaboliten enthalten, ist die Übereinstimmung beider Methoden bei Konzentrationen über $0,3 \mu\text{g/kg}$ sehr gut. Darunter sind RIA-Ergebnisse nicht aussagekräftig.

2.2.3 Latex-Agglutinationstest

Beim sogenannten "Spot-Test" bzw. "Angenics-Test" zum Nachweis einiger β -Laktam-Antibiotika, den RYAN (1983) erstmals beschrieb, wird nach kurzer Inkubation der Rohmilchprobe mit dem Enzym β -Laktamase der β -Laktamring des entsprechenden Antibiotikums geöffnet. Anschließend wird durch Säurefällung und Filtration Milchserum gewonnen, welches nach Zugabe von Latex-Partikeln, die mit dem spezifischen Antibiotikum beschichtet sind, sowie von einem gegen dieses Antibiotikum gerichteten monoclonalen Antikörper 4 Minuten auf einem beheizten Taumler inkubiert wird. Bei Vorhandensein des gesuchten Antibiotikums im Serum konkurriert dieses mit dem an die Latex-Partikel fixierten Antibiotikum um die spezifischen Bindungsstellen am Antikörper. Bei Absättigung der Bindungsstellen durch Penicillin aus der Probe bleibt die Vernetzung der Latex-Partikel aus, die bei negativen Proben erfolgt, das Reaktionsgemisch verändert sich nicht und bleibt milchig homogen. Das Fehlen des Antibiotikums im Milchserum bewirkt eine deutlich körnige Granulierung des Testansatzes. JAKSCH (1986) prüfte die Eignung des Spot-Tests zum Penicillin-Nachweis in der Milch durch vergleichende Untersuchungen mit dem Referenzverfahren zum Hemmstoffnachweis der Milch-Güte-Verordnung, dem Agardifusionstest mit *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* sowie mit dem in der Routine der Güteprüfung gebräuchlichen Brillantschwarz-Reduktionstest (BRT). Als Nachweisgrenzen wurden mit dem Spot-Test folgende Werte ermittelt: Penicillin G 0,006 I.E./ml, Cloxacillin 0,04 $\mu\text{g/ml}$ und Cefapirin 0,02 $\mu\text{g/ml}$. Mit den für den Nachweis von Cloxacillin vorgesehenen Reagenzien wurden auch Oxacillin und Dicloxacillin miterfaßt. Die Nachweisgrenze lag für beide Isoxazolylderivate bei 0,04 $\mu\text{g/ml}$. Amoxycillin, Ampicillin, Nafcillin, Cefoprazon und Cefacetril wurden mit dem

Spot-Test selbst in hohen Konzentrationen ($>12,8 \mu\text{g/ml}$) nicht erfaßt, was an der hohen serologischen Spezifität des Testsystems liegt.

2.3 Physikalisch-chemische Verfahren

2.3.1 Chromatographie

Zur Trennung von Stoffgemischen in ihre Komponenten wird das Gemisch mit einer beweglichen Phase über eine stationäre Phase transportiert, wobei ein Wechsel zwischen den beiden Phasen stattfindet, der zu einer Trennung des Gemisches infolge einer unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit der Bestandteile führt. Die stationäre Phase kann fest oder flüssig, die mobile Phase flüssig oder gasförmig sein.

2.3.1.1 Dünnschichtchromatographie

Hierbei werden die unterschiedlichen R_F -Werte der Substanzen in einem Laufmittel ausgenützt. Dieser Wert beschreibt die Strecke, die ein gelöster Stoff während der chromatographischen Trennung in Richtung Lösungsmittelstrom zurückgelegt hat. Als stationäre Phase werden hauptsächlich Kieselgel-, Silikagel-, oder Zelluloseplatten verwendet. Der Nachweis der gewanderten Antibiotika erfolgt über Bioautographie mit bestimmten Testkeimen oder UV-Detektion.

BOSSUYT et al. (1976) entwickelten ein Schema, das die Unterscheidung und Identifizierung von 14 verschiedenen Antibiotika in der Milch mittels Dünnschichtchromatographie

ermöglicht. Dazu werden aus dem Probenmaterial zunächst 4 verschiedene Extrakte hergestellt, die auf Kieselgel-, Silikagel- oder Zelluloseplatten aufgetragen werden. Als Laufmittel dienen 5 verschiedene Lösungen. Der Nachweis der isolierten Antibiotika erfolgt über Bioautographie, wobei *B. cereus*, *M. flavus*, *S. lutea* und *B. subtilis* als Testkeime verwendet werden. Die Identifizierung der Antibiotika erfolgt durch den Vergleich mit den Werten von wäßrigen Lösungen der Reinsubstanzen. Insgesamt werden für jede zu untersuchende Milchprobe mindestens 6 Dünnschichtplatten angesetzt, wobei stationäre Phase, Extrakte, Laufmittel und Testkeime miteinander kombiniert werden. Die Nachweisgrenze für Tetracycline liegt bei $0,3 \mu\text{g/ml}$, für Oxacillin bei $0,5 \mu\text{g/ml}$ und für Chloramphenicol bei $1 \mu\text{g/ml}$. Zur Bestimmung von Chloramphenicol in der Milch führten HAMANN et al. (1975 b) semiquantitative Bestimmungen durch. Der Nachweis erfolgte auf Zellulose- bzw. Kieselgelplatten. Für den Nachweis auf Zelluloseplatten wurde das Antibiotikum als Hydrat aus der Probe extrahiert. Nach der Chromatographie wurden die Platten mit einer Agar-Sporensuspension (Testkeim: *B. subtilis*) überschichtet und zur Erzielung einer Kontrastverstärkung mit einer Phenolrotlösung besprüht. Zur Chromatographie auf Kieselgelplatten kann auch der bei der Gaschromatographie verwendete Extrakt von silyliertem Chloramphenicol verwendet werden (2.2.1.3). Die Sichtbarmachung erfolgt bei völliger Dunkelheit im UV-Licht. Bei beiden Verfahren, sowohl mit der bioautographischen als auch mit der chemisch-physikalischen Detektion, können $0,01 \mu\text{g/ml}$ Chloramphenicol nachgewiesen werden. SCHWARTZ und MC DONOUGH (1984) benützten zur Chloramphenicolbestimmung Silikatgelplatten als stationäre und Äthylacetat als mobile Phase. Vor der Dünnschichtchromatographie erfolgt die Reinigung der entrahmten Milch durch eine Chromosorb 102-Säule sowie einem Kationenaustauscher (Aluminiumperlen). Durch Diazotie-

rung kann die Anwesenheit von Chloramphenicol in der Probe im Vergleich zu einer Negativ-Probe, die sich nicht lila verfärbt, festgestellt werden. Als Nachweisgrenzen werden $0,004 \mu\text{g/ml}$ bei einer Wiederfindungsrate von 30-40 % angegeben. In Versuchen mit anderen Antibiotika (Streptomycine, Tetracycline, Penicillin u.a.) wurde festgestellt, daß mit Ausnahme der Nitromide, die eine starke Farbreaktion ergaben, keines der geprüften Substanzen mit dem Nachweis von Chloramphenicol interferierten. Die Bestimmung von Tetracyclinen in der Milch durch Dünnschichtchromatographie wird von verschiedenen Autoren beschrieben (RYAN und DUPONT, 1974; BOSSUYT et al., 1976; HAMANN et al., 1979 b). RYAN und DUPONT (1974) konnten bei Verwendung von Kieselgelplatten und Detektion mittels UV-Licht $0,025-0,1 \mu\text{g/ml}$ nachweisen. BOSSUYT et al. (1976) erreichten mit Kieselgel als Adsorbens und Bioautographie (Testkeim: *B. cereus*) eine Nachweisgrenze von $0,3 \mu\text{g/ml}$. HAMANN et al. (1979 a) benützten als Trennsystem eine Zelluloseplatte, als Laufmittel n-Butanol und zum mikrobiologischen Nachweis ebenfalls *B. cereus* als Testkeim. Die Nachweisgrenzen für Oxytetracyclin und Tetracyclin lagen bei $0,05 \mu\text{g/ml}$, für Chlortetracyclin bei $0,01 \mu\text{g/ml}$. 1983 konnte HAMANN die Nachweisgrenze für alle o.a. Tetracycline deutlich senken. Dabei erfolgte die Probenaufbereitung wie 1970 von KATZ und FASSBENDER empfohlen, der pH-Wert der Proben wurde durch Zugabe von Phosphorsäure auf einen Wert von 4,5 eingestellt, zur Entfernung der physikalischen Barrieren werden die Proben anschließend zentrifugiert. Durch Extraktion über eine XAD-Amberlite-Säule und anschließendes Agardiffusionsverfahren (Testkeim: *B. cereus*) erreichte HAMANN (1983) eine Verbesserung der Nachweisgrenze auf mindestens $0,01 \mu\text{g/ml}$, wenn 100 ml Milch für die Untersuchungen zur Verfügung stehen. Der Nachweis von Isoxazolyl-Penicillinen in der Milch erfolgte bei HAMANN et

al. (1975 a) nach deren Umsetzung in Na-monohydrat. Nach Chromatographie auf Zelluloseplatten erfolgte der mikrobiologische Nachweis der β -Laktam-Antibiotika mit *B. subtilis* als Testkeim. Mit Phenolrot-Anfärbung lag die Nachweisgrenze für Oxacillin, Cloxacillin und Dicloxacillin bei $0,01 \mu\text{g/ml}$. Bei Verwendung von Kieselgelplatten erfolgte die Sichtbarmachung nach der Chromatographie mit einer UV-Lampe bei 254 nm . Bei starker Einengung der Probe lag die Nachweisgrenze bei $0,05 \mu\text{g/ml}$. MOATS (1983) verwendete zum dünnschichtchromatographischen Nachweis von Penicillin G und Cloxacillin in der Milch Silikagel als stationäre Phase. Die Sichtbarmachung der Antibiotika erfolgte durch eine Farbreaktion, die mit Ansätzen von Penicillinlösungen mit bekannter Konzentration verglichen wurden. Als Erfassungsgrenze werden $0,004 \mu\text{g/ml}$ angegeben. Zum Nachweis von Tylosin in der Milch verwendete KARKOCHA (1981) eine Chloroform/Äthylacetat-Mischung als Extraktionsmittel. Nach Entfernung der Lösungsmittel und Reinigung des Rückstandes wurde dieser in Äthanol gelöst und auf einer Silikagelplatte aufgetragen. Nach der Chromatographie in zwei Lösungssystemen (Chloroform/Aceton sowie Äthylacetat/Methanol) wurden die isolierten Antibiotika durch Aufsprühen einer Xanthidrol-Lösung in Salzsäure und anschließender Erhitzung der Platte (15 Minuten bei 110°C) sichtbar gemacht. Mit dieser Methode konnten $0,01 \mu\text{g/ml}$ nachgewiesen werden.

BOSSUYT et al. (1976) verwendeten für den Nachweis von Streptomycin Zelluloseplatten als stationäre und Methanol-Ammoniumchlorid-Lösung als mobile Phase. Zur Bioautographie wurde *B. cereus* als Testkeim verwendet, die Nachweisgrenze des Verfahrens liegt bei $3 \mu\text{g/ml}$. HAMANN et al. (1979 b) modifizierten dieses Verfahren und erreichten dadurch eine Nachweisgrenze von $0,1-10 \mu\text{g/ml}$. Außerdem wurde von ihnen eine Methode erarbeitet, bei der die Milchproben durch Zentrifugieren und Filtrieren entfettet und dann direkt,

ohne weitere Extraktionsschritte auf die Zelluloseplatten aufgetragen wurden. Als Nachweisgrenze dieses Verfahrens wird 0,5-1,0 µg/ml angegeben.

2.3.1.2 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Durch die hohe Trennkraft ist die HPLC besonders geeignet, eng verwandte Verbindungen darzustellen und damit u.a. Metabolisierungsvorgänge zu erforschen. Die Trennung eines Substanzgemisches in der Säule erfolgt durch unterschiedliche Adsorption der verschiedenen Molekülsorten eines Gemisches an der stationären Phase. Ein System, in dem die stationäre Phase polarer ist als die mobile, wird als "straight phase system" bezeichnet. Hier werden polare Verbindungen stärker gebunden als apolare. Wenn dagegen die stationäre Phase weniger polar ist als die mobile, bezeichnet man das System als "reversed phase system" (RP); entsprechend werden hier apolare Verbindungen stärker gebunden als polare. Als Maß für die Tendenz eines Stoffes, sich bevorzugt in der einen oder anderen Phase aufzuhalten, dient der Verteilungskoeffizient "K". Voraussetzung für die Trennung eines Stoffgemisches ist seine Zusammensetzung aus Komponenten mit verschiedenen Verteilungskoeffizienten. Vor dem Beschicken der Säule steht eine teilweise recht aufwendige Vorbereitung der Milch. Zur Bestimmung von Chloramphenicol in der Milch extrahieren die meisten Autoren zunächst mit Äthylacetat, wobei nur freies Chloramphenicol in den Extrakt gelangt (AIKAWA und CHIKUMA, 1979; BECHEIRAZ et al., 1983; WAL et al. 1980; RUIG und HOOIJERINK, 1985). Bei gleichzeitiger Bestimmung von Chloramphenicol und Furazolidon bzw. von verschiedenen Nitrofuranen (PETZ, 1982, 1983 a, b) wurde mit Acetonitril extrahiert. Vor der HPLC müssen die Extrakte gereinigt werden, was in mehreren - bis

zu 16 - Teilschritten (BECHEIRAZ et al., 1983) und mit verschiedenen Lösungsmitteln erfolgt. Eine Übersicht der HPLC-Verfahren zum Chloramphenicol-Nachweis zeigt Tabelle 2. Bei TERADA und SAKABE (1985), die den Nachweis von Penicillin G und V sowie Ampicillin, ein amphoterer β -Laktam-Antibiotikum, in der Milch führten, wurden die Milchproben zunächst an einer C 18 Sep-Pak Kartusche aufgetrennt. Die β -Laktam-Antibiotika werden nach dem Eluieren mit 15 %igem Methanol der HPLC zugeführt. Als mobile Phase diente Na-allylsulfonat, der Nachweis erfolgte mit einem UV-Detektor bei 220 bzw. 210 nm. Die Identifizierung des Antibiotikums erfolgte durch einen Vergleichsansatz mit Penicillinase, als Nachweisgrenze für Penicillin G und V sowie Ampicillin wurden 0,03 $\mu\text{g/ml}$ ermittelt, die Wiederfindungsraten bei Konzentrationen von 0,1 - 0,5 $\mu\text{g/ml}$ lagen über 87 %. MOATS (1983) bestimmte β -Laktam-Antibiotika mit RP-Säule und einem Phosphorsäure-Acetonitrilgemisch als mobile Phase. Als Nachweisgrenze für Penicillin G und V wurden 0,005 $\mu\text{g/ml}$, für Cloxacillin 0,002 $\mu\text{g/ml}$ ermittelt.

Für den Nachweis von Sulfonamiden in der Milch wurde von ALAWI und RUSSEL (1981) ebenfalls eine RP-Säule verwendet. Als mobile Phase diente ein Methanol/ LiClO_4 -Gemisch. Mittels elektrochemischem Detektor konnten 0,01-1,8 $\mu\text{g/ml}$ mit Wiederfindungsraten von 94,4-110 % nachgewiesen werden.

Tabelle 2: Nachweis von Chloramphenicol in der Milch durch HPLC

Flüssigkeits- chromatogr. Säule	mobile Phase	Nachweisgrenze (µg/ml) (Wiederfindungsrate)	Autoren
Bondapak	30 % Methanol	10 1	AIKAWA u. CHIKUMA (1979)
5 µm C18 Spherisorb ODS	Wasser/Methanol 70+30	0,005	WAL et al. (1980)
Hypersil H5 ODS	Wasser/Acetonitril/ Acetatpuffer 80+20+1	0,002 0,01	BECHEIRAZ et al. (1983)
MOS Hypertil 3 µm	Natriumacetatpuf- fer/Acetonitril	0,02	PETZ (1983)
Hypersil ODS 5µm		1	RUIG u. HOIJERINK (1985)

2.3.1.3 Gaschromatographie

Mit dieser Methode können Substanzen nachgewiesen werden, die flüchtig sind bzw. sich bei hohen Temperaturen verdampfen lassen. Viele Substanzen, die diese Voraussetzung nicht erfüllen, können deshalb erst nach ihrer Derivatisierung indirekt bestimmt werden. Zum Nachweis stehen verschiedene Detektionssysteme zur Verfügung. Am häufigsten wird der Elektroneneinfangdetektor (ECD) verwendet, der eine höhere Substanzspezifität aufweist als der Flammenionisationsdetektor (FID).

Die Chloramphenicol - Rückstandsbestimmung in der Milch mittels Gaschromatographie wird von verschiedenen Autoren beschrieben. Dabei wird die erforderliche Flüchtigkeit des Chloramphenicol durch Derivatisierung zum Trimethylsilylester (TMS) erreichten HAMANN et al., 1975 b; KARLOWSKI, 1976; HOLLSTEIN et al., 1981; MALISCH et al., 1984). Der gaschromatographische Nachweis erfolgt bei HAMANN et al. (1975), HOLLSTEIN et al.

(1981) und MALISCH et al. (1984) mittels Elektroneneinfangdetektor bzw. bei KARLOWSKI (1976) durch Verwendung eines Flammenionisationsdetektors. Als Nachweisgrenze für Chloramphenicol in der Milch ermittelten HAMANN et al. (1975 b), KARLOWSKI (1976) und HOLLSTEIN et al. (1981) 0,01 µg/ml. MALISCH et al. (1984) geben die Nachweisgrenze mit 0,001 µg/ml an.

WAL et al. (1979) setzten Chloramphenicol in ein Heptafluorobutyrat um, und bestimmten den Rückstand mit einem Elektroneneinfangdetektor. Die Nachweisgrenze lag bei 0,05 µg/ml mit einer Wiederfindungsrate von 80,9 %.

HOLTMANNSPÖTTER und THIER (1982) setzten 6 verschiedene Sulfonamide und Chloramphenicol Eiern, Milch und Fleisch zu und bestimmten anschließend beide Wirkstoffgruppen in

einem Verfahren. Da die Antibiotika polar und nicht flüchtig sind, werden sie durch Methylierung mit Diazomethan und anschließender Acylierung mit Heptafluorbuttersäureanhydrid umgesetzt und die Derivate an einer Kapillarsäule aufgetrennt. Die Wirkstoffe konnten in Eiern und Milch in Konzentrationen unter $0,1 \mu\text{g/ml}$ erfaßt werden. Die Wiederfindungsrate für die Sulfonamide in Milch lag zwischen 78 und 89 %, für Chloramphenicol bei 94 %. Der Nachweis erfolgte mit einem thermoionischen Detektor (TSD). Außerdem stellten sie fest, daß mit diesem Verfahren auch dem Fleisch zugesetztes Furazolidon erfaßt werden kann.

MALISCH et al. (1984) änderten das Verfahren von HOLTMANNSPÖTTER und THIER (1982) mit dem Ziel ab, bei möglichst geringem Arbeitsaufwand die Einhaltung der vorgesehenen Höchstmengen von $0,1 \mu\text{g/ml}$ für Sulfonamide und $0,001 \mu\text{g/ml}$ für Chloramphenicol (3. VO über Stoffe mit pharmakologischer Wirkung vom 5.4.1984) zu überwachen. Dazu werden die Proben zunächst in verschiedenen Extraktionsschritten aufbereitet. Sulfonamide werden durch HPLC chromatographiert, Chloramphenicol wird kapilarchromatographisch mit ECD bestimmt.

ARNOLD und SOMOGYI (1985) verglichen die Ermittlung von Chloramphenicol-Rückständen in der Milch mit Gaschromatographie und Radio-Immuno-Assay (s. auch 2.2.2). Zur Aufreinigung wird die entfettete Milch durch eine Sep Pak C 18 - Kartusche gesaugt. Die noch störenden Milchbestandteile werden mit Wasser oder einem Acetonitril-Gemisch (1+4) ausgewaschen. Es folgt die Eluierung des Chloramphenicols mit 3 ml eines Acetonitril-Wasser-Gemischs und Extraktion durch Zugabe von Äthylacetat aus dem Eluat. Nach dem Trocknen wird der Rückstand silyliert und der Chloramphenicol-silyläther nach dem Verdampfen

sofort in n-Hexan gelöst. Die Bestimmung des Chloramphenicol-silyläthers erfolgt durch Gaschromatographie mit Stickstoff oder einem Argon-Methan-Gemisch als Trägergas unter Verwendung eines Elektroneneinfangdetektors. BERGNER-LANG und KÄCHELE (1985) verwendeten die von der Arbeitsgruppe von Arnold ausgearbeitete Methode (BOERTZ, 1984) zur Untersuchung von Chloramphenicol in Milch. Als Nachweisgrenzen dieses Verfahrens ergaben sich Werte von $0,00003-0,0001 \mu\text{g/ml}$, je nach Empfindlichkeit des ECD (Nickel 63). Bei Konzentrationen von $0,002 \mu\text{g/ml}$ wurden Wiederfindungsraten von 75-99 % ermittelt.

RYAN et al. (1975) entwickelten eine Methode zur Bestimmung von Nitrofuranen in Milch und Fleisch mit Gas-Flüssigkeits-Chromatographie und ECD. Die Nitrofurane werden zunächst mit Äthylacetat extrahiert. Nach Zentrifugieren und Trocknen wird der organische Rückstand mit Hexan aufgenommen. Die Nitrofurane werden durch Zugabe von HCl zu Nitrofurfuraldehyd hydrolysiert. Die Extraktion der Hydrolyse-Produkte erfolgt mit Benzen. Mit dieser Methode sind $0,01 \mu\text{g/ml}$ in der Milch nachweisbar. Die Wiederfindungsrate bei dieser Konzentration liegt für Nitrofurazon bei 77 % und für Furazolidon bei 54 %. Eine Methode zur gaschromatographischen Identifikation von Isoxazolyl-Penicillinen wurde 1975 von HAMANN et al. erarbeitet. Dazu wird die zu untersuchende Milchprobe vollständig fraktioniert. Nach mehrfacher Flüssig-Flüssig-Extraktion werden die Isoxazole mit gasförmigem Diazomethan methyliert. Nach einem weiteren Extraktionsschritt erfolgt die Aufnahme des Rückstandes mit Aceton. Die Lösung wird dann in den Gaschromatographen injiziert. Um optimale Nachweisgrenzen zu erzielen, mußte eine besonders hohe Konzentrierung der Probenextrakte vorgenommen werden. Ausgehend von 100 ml Milchprobe wurde eine Nachweisgrenze von $0,01 \mu\text{g/ml}$, bezogen auf die Ausgangsmilch, ermittelt.

Zur gaschromatographischen Darstellung der Tetracycline wurden von HAMANN et al. (1979 a) eine Vielzahl von Derivatisierungsmitteln geprüft. Dabei stellte sich heraus, daß das Tetracyclinemolekül äußerst empfindlich ist und oftmals nur eine unzureichende Derivatisierung oder sogar eine Zerstörung des Moleküls erreicht wurde. Durch Silylierung zum Trimethylsilylester konnte jedoch die vollständige Derivatisierung erreicht werden. Als Nachweisgrenzen werden Werte von 0,5-1,0 µg/ml bei 100 ml Ausgangssubstrat angegeben.

2.3.2 Massenspektrometrie

Bei der Massenspektrometrie werden aus einer Verbindung die ionisierte Form der Verbindung und eine Reihe ebenfalls ionisierter Fragmente gebildet und aufgrund der verschiedenen Masse/Ladungsverhältnisse (m/e -Werte) aufgetrennt. Die Bruchstellen, an denen die Verbindungen zerfallen und so ein Massenspektrum produzieren, ist für die einzelnen Verbindungen charakteristisch. Die Massenspektren bestehen aus einer Reihe von Peaks oder Linien, die den einzelnen m/e -Werten der Fragmentionen aus der Verbindung entsprechen. Meist wird die Ionisierung durch Elektronenbeschuß vorgenommen. Die Elektronen werden durch thermoionische Emission aus Wolframdrähten freigesetzt und durch ein angelegtes Feld von 50-100 V beschleunigt. Bei der chemischen Ionisierung durch Ionen einfacher Kohlenwasserstoffe (wie Methan oder Butan) und bei der Feldionisierung durch das Anlegen einer hohen Spannung erreicht. Bei den beiden letztgenannten Verfahren erfolgt die Fragmentierung der Moleküle seltener als beim Elektronenbeschuß, deshalb sind die Spektren der entstandenen Molekülionen einfacher. Mit Hilfe einer Reihe negativ geladener elektrostatischer Platten werden die Ionen zu konstanter Geschwindigkeit im Vakuum beschleunigt und dann von ihrer ursprünglichen Bahn durch ein

magnetisches Feld abgelenkt. Indem man nun entweder das magnetische Feld oder die Beschleunigungsspannung verändert, werden die Ionenbahnen so eingestellt, daß Fragmentationen eines bestimmten m/e -Wertes genau in den Schlitz des Detektors einfallen. Als Detektor wird meist eine einfache Elektrode oder ein Elektronenmultiplier verwendet. Da für die Massenspektrometrie ein hoher Reinheitsgrad vorausgesetzt wird, wird das Verfahren häufig im Anschluß an eine Gaschromatographie oder HPLC verwendet.

TRALDI et al. stellten 1985 ein Tandem-Massenspektrometrie-Verfahren zur schnellen und spezifischen Bestimmung von Oxytetracyclin -Rückständen in Milch und Fleisch vor. Die Milch- und Fleischproben werden mit reinem Äthanol versetzt und zentrifugiert (4000 U/Min.). Nach 5 Minuten wird die organische Schicht dekantiert. Der Einweißrückstand wird durch Aufrühren in reinem Äthanol nochmals resuspendiert und anschließend nochmals zentrifugiert. Der organische Überstand wird zu dem ersten Dekantat gegeben. Nach dem Eintrocknen wird der Rückstand in konzentriertem Äthanol aufgenommen. 1 μ l dieses Extraktes wird nun zur Spektrometrie in das (ZAB-2F)-Massenspektrometer injiziert. Durch Elektronenbeschuß werden Ionen erzeugt, die durch ein Magnetfeld abgelenkt werden und aufgrund ihres m/e -Wertes voneinander getrennt werden. Um den stabilen Ionen, die die feldfreie Zone erreichen, interne Energie zuzuführen, wird der Ionenstrahl durch eine "Kollisionskammer" geleitet, die ein Gas (N_2) enthält. Durch die Zusammenstöße der Ionen mit den Gasmolekülen und der damit verbundenen Energieübertragung, werden die Ionen angeregt, wodurch eine Reihe von Fragmentierungen und eine geringe Änderung der Ionenrichtung ausgelöst werden können. Diese Form der Energieübertragung wird als "CAD" (collisionally activated decomposition oder dissociation) bezeichnet. Bei der Auswertung ergab sich, daß die Massenspektren von Milch und Fleisch nicht mit dem des Oxytetracyclins interferierten. Für den quantitativen Nachweis von Oxytetracyclin wird das am häufigsten

vorkommende Ion mit dem m/e-Wert von 442 bestimmt. Als interner Standard wurde ein Benzofuranderivat gewählt, das von der chemischen Struktur her völlig anders (um Überlappingsreaktionen zu vermeiden), aber isobar mit der nachzuweisenden Substanz ist. Als Nachweisgrenze von Oxytetracyclin in Milch und Fleisch wird ein Wert von $0,0011 \pm 0,0001 \mu\text{g/ml}$ bei Wiederfindungsraten von $96,48 \pm 2,1 \%$ bzw. $94,2 \pm 1,8 \%$ angegeben.

Zum Nachweis von Isoxazolyl-Penicillinen führten HAMANN et al. (1975 a) die entsprechenden Methylester nach gaschromatographischer Auftrennung direkt über die Kopplungsbausteine in die Ionenquelle eines Massenspektrometers. Dabei wurde ein Varian MAT CH 7 mit einem Varian Aerograph 17451/1 verwendet. Mit größer werdendem Molekulargewicht der Isoxazolyl-Penicilline traten auch schwerere Bruchstücke auf. Molekularionen lassen sich durch diese Methode (Elektronenstoß-Ionenquelle) nicht darstellen. Als Nachweisgrenze wird $0,01 \mu\text{g/ml}$ angegeben.

Zum massenspektrometrischen Nachweis von Chloramphenicol verwendeten HAMANN et al. (1975 b) dieselben Gerätschaften, wie oben für die Isoxazolyl-Bestimmung beschrieben wurde. Nach gaschromatographischer Auftrennung der Substanzen konnte das Chloramphenicol als Trimethylsilylester mit einer Nachweisgrenze von $0,01 \mu\text{g/ml}$ identifiziert werden.

2.3.3 Elektrophorese

Unter Elektrophorese versteht man die Wanderung geladener Moleküle in einem elektrischen Feld. Man unterscheidet hierbei die kontinuierlichen Verfahren, bei denen ständig neues Substanzgemisch zugeleitet wird, von den diskontinuierlichen, bei denen das Substanzgemisch einmalig, vor dem Anlegen der Spannung, dem Träger zugeführt wird. Bei der Hochspannungspapier-Elektrophorese stellt Filterpapier den Träger dar, den die Probenlösung aufgetropft wird. Verfahren, bei denen

gelartige Stoffe als Träger verwendet werden, bezeichnet man je nach angelegter Spannung als Hochspannungs-Gel-Elektrophorese oder als Niederspannungs-Gel-Elektrophorese. Um die Hemmstoffe nach der Trennung sichtbar zu machen, bedient man sich meist der Bioautographie. Dabei werden die Elektrophorese-Platten mit Antibiotika-Nachweisagar überschichtet, der mit Testkeimen beimpft ist. Nach der Inkubation wird das Ergebnis anhand der Hemmzonen ausgewertet. BILLON und TAO (1979) benützten für ihre Hochspannungs-Gel-Elektrophorese verschiedene Laufmedien. Bei einer Spannung von 150-160 V und einer Stromstärke von 40 mA dauerte die Laufzeit 4 Stunden. Die Bioautographie erfolgte mit *B. cereus*, *S. lutea* oder *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* als Testkeim. Zum Vergleich wurden Standardlösungen der verschiedenen Antibiotika angesetzt. Die Nachweisgrenzen lagen um ein Vielfaches unter denen, die allein mit mikrobiologischen Verfahren erzielt werden konnten: 0,0005 I.E. Penicillin/ml, 2,5 µg Chloramphenicol/ml, 0,1 µg Streptomycin/ml und 0,05 µg Chlortetracyclin/ml Milchprobe. Da mit mikrobiologischen Verfahren (außer für Penicillin) i.a. eine Identifizierung der Hemmstoffe in der Milch nicht möglich ist, entwickelten STADHOUDERS et al. (1981) ein Verfahren, mit dem 11 Antibiotika identifiziert werden können. Beim Extraktionsverfahren orientierten sie sich nach BOSSUYT et al. (1976). Um festzustellen, ob die Proben hemmstoffhaltig sind, werden die Extrakte zunächst im Agardiffusionsverfahren mit *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* C 953 geprüft. Zur Trennung und Identifizierung der hemmenden Substanzen werden die Extrakte auf das Laufmedium (1 %iger Agar in einem TRIS-Malein-Säure-Puffer) aufgetragen. An die Platin-Elektroden wird für 1,5 Stunden eine Spannung von 500 V angelegt, die Stromstärke beträgt 100-150 mA. Für die Bioautographie werden entweder *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* (C 953) oder *B. cereus* var. *mycoides* (ATCC 11778) verwendet. Als Kontrolle werden Standardlösungen mit bekannten Antibiotika-Konzentrationen verwendet. In der Arbeit von LOTT et al. (1985) wird sowohl Milch direkt, als

auch, insbesondere bei niedrigen Antibiotika-Konzentrationen, nach Acetonitril-Wasser-Extraktion untersucht. In Vorversuchen wurden die Proben mit Hilfe von mikrobiologischen Verfahren getestet. Als Laufmedium diente 1 % Agar sowie 1 % Agarose in Tris/Bernsteinsäure-Puffer. Die Elektrophorese bei 1500 V dauerte 1,5 Stunden. Bei der Auswahl des Testkeimes zur Bioautographie orientierte man sich an den Ergebnissen aus den Vorversuchen. Das hier beschriebene Verfahren dient vor allem als qualitative Methode: Nur unter bestimmten Bedingungen kann sie auch semiquantitativ durchgeführt werden.

2.3.4 Laser-Streuung

WYATT et al. (1976) entwickelten zur quantitativen Bestimmung von Antibiotika in Milch, Serum, Urin und Galle ein Verfahren, das auf der Messung von Veränderungen im Laser-Streuungsmuster von Antibiotika-sensiblen Keimsuspensionen beruht. Ein eng gebündelter ("fine laser beam"), vertikal polarisierter He-Ne-Laserstrahl wird so auf eine konische Kuvette mit der Keimsuspension (ca. 10^6 /ml) gerichtet, daß der Strahl die Kuvette diametrisch passiert. Das Streuungsmuster wird durch einen "collimated" Detektor, der um die Kuvette rotiert und die Intensität des gestreuten Lichts registriert, ermittelt. Die Veränderung der Streuungsmusterintensität als Funktion des Detektorwinkels wird als sogenanntes "differenziertes Lichtstreuungsmuster" bezeichnet. Zum Nachweis von Penicillin G, Chlortetracyclin und Furaltadon diente *S. aureus* SS 41 als Testkeim und für Neomycin wurde *S. aureus* SS 329 benutzt. Für das Verfahren wurde Milch zu Molke umgesetzt und untersucht. Als Nachweisgrenzen für die einzelnen Antibiotika wurden folgende Konzentrationen ermittelt: Penicillin G 0,003 µg/ml, Chlortetracyclin 0,03 µg/ml, Fural-

tadon 3 µg/ml und Neomycin 0,1 µg/ml.

2.3.5 Spektroskopische Verfahren

Je nach Art und Erzeugung der Beobachtung unterscheidet man Emissions-, Absorptions- und Fluoreszenzspektroskopie, mit deren Hilfe man eine große Anzahl von Substanzen quantifizieren kann.

FAAR entwickelte 1962 ein Verfahren zur Bestimmung von Nitrofurazon in Milch. Dabei wird nach Denaturierung des Milcheiweißes und dessen Abtrennung durch Zentrifugieren die Absorption des Zentrifugates in 5 µ Abständen bei Wellenlängen zwischen 360 und 390 µ mit dem Spektrophotometer gemessen. Das Absorptionsmaximum liegt bei 375 µ. Als Nachweisgrenze wird 0,5 µg/ml angegeben. COX und HEOTIS beschrieben 1962 ein Verfahren zur Bestimmung von Nitrofurazon und Furaltadon in Rohmilch, das auf der Umwandlung der nachzuweisenden Substanzen in 5-nitro-2-furaldehyd-phenylhydrazon beruht. Nach chromatographischer Abtrennung des Phenylhydrazon von interferierenden Milchpigmenten wird die Absorption des Eluats bei 430 µ gemessen. Mit dieser Methode wurde eine Nachweisgrenze von 0,25-5 µg/ml für diese Nitrofurane erreicht. 1963 bestimmten COX und HEOTIS Furaltadon mit einer Methode, bei der nach zweifacher Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Chloroform und 0,1 N HCl die Absorption in 10 µ-Abständen von 320 bis 400 µ gemessen wird. Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei 0,01 µg/ml Furaltadon/ml mit einer Genauigkeit von ± 10 % und einer Wiederfindungsrate von 95 %. STONE (1964) modifizierte das Verfahren von COX und HEOTIS (1962) in dem zur Verhinderung der Gelbildung des Extrakts NaCl zugegeben wird und erreichte eine Nachweisgrenze von 0,01 µg/ml Nitrofurazon.

MUNNS et al. (1985) beschrieben ein Verfahren zur Bestimmung von 8 β -Laktam-Antibiotika in Milch durch Fluoreszenz-Flüssig-Chromatographie. Durch Einwirkung von Penicillinase wird der β -Laktam-Ring aufgespalten, wodurch die entsprechenden Penicilloat-Produkte entstehen. Nach Denaturierung der Proteine in der Probe durch Acetonitrilzugabe werden diese abzentrifugiert. Zur Entfettung wird Methylenchlorid zugegeben. Durch Reduktion Penicilloate mit HgCl_2 werden die Seitenketten mit endständigen Aldehydgruppen freigesetzt. Diese Penilloaldehyde werden mittels Methylenchlorid extrahiert. Zur Markierung wird Danzylhydrazin (nach TSUJI et al., 1978 und LEVINE, 1960) zugegeben. Nach Trennung der markierten Seitenketten durch Flüssigchromatographie (C_{18} -Säule, mobile Phase: Acetonitril-Wasser-Gemisch) und Anregung bei 254 nm erfolgt die Emissionsmessung bei 500 nm. Die Nachweisgrenzen für Benzylpenicillin, Phenoxymethylpenicillin, Pheneticillin und Nafcillin liegen mit 0,0025 $\mu\text{g/ml}$ niedriger als für die halbsynthetischen Isoxazolympenicilline (Oxacillin, Cloxacillin, Dicloxacillin und Methicillin) mit 0,005 $\mu\text{g/ml}$. Diese geringere Empfindlichkeit für die Isoxazolympenicilline hat seine Ursache in der inkompletten Hydrolyse des β -Laktam-Ringes durch Penicillinase.

2.4 Biochemische Verfahren

1980 beschrieben FRERE et al. eine enzymatische Methode zur schnellen Bestimmung von β -Laktam-Antibiotika in der Milch. Das Verfahren beruht auf der Inaktivierung des Enzyms R 39 DD-Carboxypeptidase durch β -Laktam-Antibiotika.

Der Nachweis ist sehr spezifisch für diese Antibiotika, die allerdings nicht voneinander unterschieden werden können. Aufgrund der Massengleichgewichtskonstanten für die Reaktionen zwischen den einzelnen Antibiotika und der Carboxypeptidase werden die β -Laktam-Antibiotika in zwei Gruppen eingeteilt. Zur Gruppe I gehören Ampicillin, Benzylpenicillin, Phenoxymethylpenicillin, Cephaloglycin und Cephalotin. Bei diesen Antibiotika liegt das Massengleichgewicht stark auf der Seite des inaktiven Enzym-Antibiotikum-Komplexes, während bei den β -Laktam-Antibiotika der Gruppe II, zu der Carbenicillin, Methicillin, Oxacillin, Cloxacillin und Cephalexin gehören, das Gleichgewicht nicht so stark auf die Seite des inaktiven Enzym-Antibiotikum Komplexes verschoben ist. Deshalb müssen Antibiotika der letztgenannten Gruppe 10 mal länger mit dem R 39-Enzym inkubiert werden, als dies bei Antibiotika der Gruppe I der Fall ist. Auch die Nachweisgrenze liegt für die Antibiotika der Gruppe II 10 mal höher als bei der Gruppe I. Zur Vorbereitung der Milchproben für den Test werden diese zunächst mittels Äthanol- oder Labzugabe deproteinisiert. Der Überstand nach der Behandlung mit Äthanol wird verdampft. Anschließend wird der trockene Rückstand in HEPES-Puffer und 10 μ l einer Lösung mit 0,16 μ g R 39 DD-Carboxypeptidase aufgenommen. Der Überstand aus der Labbehandlung wird ebenso gelöst. Während der Inkubationszeit (10 bzw. 100 Min.) bei 37° C verbinden sich die β -Laktam-Moleküle mit den Enzymmolekülen zu einem inaktiven Komplex. Nach Zugabe des Substrats Diacetyl-L-Lysyl-D-Alanyl-D-Alanin wird das Gemisch 30 Minuten bei 30° C bebrütet. Die verbleibenden aktiven Enzymmoleküle spalten vom Substrat die Aminosäure D-Alanin hydrolytisch ab. Je mehr β -Laktam-Antibiotika ursprünglich in der Probe vorhanden waren, desto geringer ist die Enzymaktivität,

desto weniger D-Alanin wird also freigesetzt. Zur Bestimmung des freien D-Alanin wird schließlich ein Enzymsubstrat zugegeben (D-amino-acid-oxidase-peroxidase-o-dianisidin), welches die Aminosäure durch Transaminierung in Pyruvat und und H_2O_2 umwandelt. Unter Einwirkung der Peroxidase wird o-Dianisidin oxidiert, wobei eine chromogene Komponente entsteht, die ihr Absorptionsmaximum bei 460 nm hat und photometrisch bestimmt wird. Als Nachweisgrenzen werden für Antibiotika der Gruppen I und II Werte zwischen 5 und 50 pmol/ml angegeben.

Bei der Methode von LALOUX et al. (1982), die eine Modifikation der von FRERE et al. (1980) beschriebenen darstellt, erfolgt die Auswertung visuell. Die Erfassungsgrenze für β -Laktam-Antibiotika lag bei 0,010-0,020 I.E./ml Milch bei einer Testdauer von 20 Minuten. Wenn keine β -Laktam-Antibiotika in der Probe waren, behielt das Enzym seine ganze Aktivität, was sich nach Zugabe von Schwefelsäure durch eine rosa Verfärbung zeigte, während sich bei positivem Testausfall eine gelbliche Farbe bildete. Die Reagenzien für diesen Test werden unter der Bezeichnung "Penzym-Test" vertrieben (Société U.C.B. Bioproducts S.A.).

MICHALSKI et al. (1984) überprüften und bewerteten die Brauchbarkeit des Penzym-Tests zum Nachweis von Penicillinen in der Milch. Als Nachweisgrenze ermittelten sie eine Konzentration von 0,05 IE/ml Milch. Dem Test wurde einfache Handhabung und kurze Dauer bis zum Erhalt der Ergebnisse bescheinigt (50 Minuten).

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Material

3.1.1 Versuchstiere

Für den Versuch wurden von September 1984 bis August 1985 insgesamt 113 Tiere aus 42 landwirtschaftlichen Betrieben unter Antibiotikaschutz trockengestellt. Die Versuchstiere stammten aus kleineren bis mittleren Betrieben im Schwarzwald und wurden alle mit der Maschine gemolken. Sie gehörten größtenteils der Schwarzbunten, ferner der in diesem Gebiet heimischen Vorderwälderrasse und den Rotbunten an. Einige Tiere der Fleckviehrasse waren ebenfalls in den Versuch einbezogen (Tabelle 3).

Tabelle 3 : Rasseverteilung der Versuchstiere

	Anzahl	Anteil
Schwarzbunte	51	45,1 %
Vorderwälder	30	26,5 %
Rotbunte	23	20,4 %
Fleckvieh	9	8,0 %

Das Durchschnittsalter der Tiere lag bei 6 Jahren; 76 % waren zwischen 4 und 7 Jahre alt. Teilweise wurden die Kühe in den letzten Tagen vor dem Trockenstellen nur noch einmal täglich gemolken, um die Milchmenge zu verringern. Am Tag des Trockenstellens betrug die durchschnittliche Milchmenge 4 Liter pro Tag (Tabelle 4).

Tabelle 4 : Milchmenge pro Tier am Tag des Trockenstellens

Milchmenge pro Tag in Liter	Anzahl der Tiere (%)	
1	7	(6,2)
1-2	6	(5,3)
2-3	19	(16,9)
3-4	18	(15,9)
4-5	15	(13,3)
5-6	18	(15,9)
6-7	13	(11,5)
7-8	10	(8,8)
8	7	(6,2)

3.1.2 Trockensteller

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Präparat geprüft, das zum Trockenstellen klinisch gesunder Euter von Milchkühen verwendet wird und unter dem Namen Mastitar R forte von der Firma Vemie vertrieben wird.

Ein Injektor zu 9 g enthält 1030,0 mg Procain-Penicillin-G (entsprechend 1 000 000 I.E.), 320 mg Penicillin-G-Kalium (entsprechend 500 000 I.E.) und 780 mg Neomycin-sulfat. Die Suspension enthält als Trägermedium, nach Auskunft der Firma Vemie, eine Mischung aus mineralischen Ölen, der zur Resorptionsverzögerung Aluminiummonostearat zugesetzt ist.

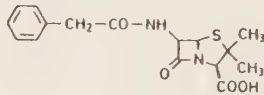
Abbildung 1 zeigt die Summenformeln, Molekulargewichte und Wasserlöslichkeit der Penicillin-Bestandteile der Suspension, die Strukturformeln von Penicillin und Neomycin können der Abbildung 2 entnommen werden.

Abbildung 1: Summenformel, Molekulargewicht und Wasserlöslichkeit der Penicillin-Komponenten

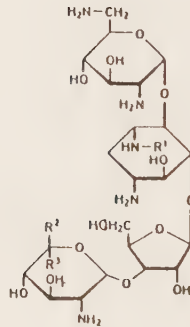
	Summenformel	Molekulargewicht	Wasserlöslichkeit bei 28°C
Procain-Penicillin G	$C_{16}H_{18}N_2O_4SK;$ $C_{13}H_{20}N_2O_4 \times H_2O$	588,71	4,5
Penicillin-G-K	$C_{16}H_{17}N_2O_4SK$	342,47	20

Abbildung 2 : Strukturformeln der Antibiotika-Komponenten im Trockenstellpräparat

Penicillin-G



Neomycin



Beide Penicillin-Komponenten sind Kalium-Salze des Penicillin-G, wobei das Procain-Penicillin-G-Molekül außerdem mit Procain (p-Aminobenzoessäure-diäthylaminoäthylester) verestert ist.

Durch die Hemmung der Zellwandbiosynthese wirken β -Laktam-Antibiotika vor allem im grampositiven Bereich bakterizid. Neomycin wirkt durch Beeinflussung der bakteriellen Proteinsynthese bakterizid und verfügt über ein breites Wirkungsspektrum mit Schwerpunkt im gramnegativen Bereich. Nach der Applikation des Trockenstellpräparates wird durch den relativ leicht wasserlöslichen Penicillin-G-K- Anteil rasch ein hoher Wirkstoff-Initialspiegel erreicht, der dann durch die schwer wasserlösliche Procain-Penicillin-G- Komponente für ca. 3-4 Wochen aufrecht erhalten wird.

3.2 Methodik

Der Versuchsablauf läßt sich in zwei Abschnitte einteilen:

1. Vor dem Trockenstellen:

Rückstandsanalytische und zyto-bakteriologische Untersuchung (Hemmstoffe) von Viertelgemelksproben, anschließendes Trockenstellen mit Mastitar^R forte.

2. In der folgenden Laktation:

Rückstandsanalytische und bakteriologische Untersuchung von Viertelgemelksproben.

3.2.1 Entnahme der Milchproben

Vor dem Trockenstellen sowie am 7. Tag post partum (p.p.) wurden aus den meisten (85,2 bzw. 87,9 %), am 6.Tag p.p. aus allen Eutervierteln Milchproben entnommen. Die Probenentnahme erfolgte entsprechend dem von der DVG (1980) beschriebenen Referenzverfahren. Vor dem Trockenstellen wurden die meisten Proben aus dem Anfangsgemelk gewonnen. Für die Untersuchung p.p. auf Penicillin- und Neomycinrückstände wurden zunächst bei einigen Tieren Anfangs-, Mittel- und Endgemelke der Viertel- sowie Gesamtgemelke, später ausschließlich Viertelendgemelke untersucht. Die unkonservierten Milchproben wurden sofort auf 6° C abgekühlt und innerhalb von 12 Stunden untersucht.

3.2.2 Applikation des Trockenstellers

Nach der Entnahme der Viertelgemelksprobe wurde das Euter gründlich ausgemolken und die Zitzenkuppen desinfiziert. Anschließend wurde in jedes Euterviertel der Inhalt eines Injektors Mastitar^R forte eingebracht, was

in einigen Fällen nach gründlicher Unterweisung, auch durch den Tierbesitzer selbst erfolgte. Im allgemeinen erfolgte das Trockenstellen mindestens 35 Tage vor dem errechneten Geburtstermin, um die für das Präparat vorgeschriebene Wartezeit einzuhalten. Eine zusätzliche antibiotische Vor- oder Nachbehandlung wurde nicht vorgenommen.

3.2.3 Nachweis von Hemmstoffen

Für den Nachweis von Hemmstoffen wurde vor dem Trockenstellen der Agardiffusionstest mit *B. subtilis* NCTC 8236 als Testkeim verwendet. In der neuen Laktationsperiode wurden die Viertelgemelksproben vom 6. und 7. Tag p.p. zusätzlich mit *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* C 953 als Testkultur im Agardiffusionstest und im Brillantschwarz-Reduktionstest (BRT) geprüft. Die Proben vom 6. Tag p.p. wurden nach Ansatz im Agardiffusionstest für weitere Untersuchungen eingefroren, während die Proben vom 7. Tag p.p. aus labor-technischen Gründen gleich eingefroren und erst später im Agardiffusionstest untersucht wurden. Der BRT wurde bei allen Proben später nach deren Auftauen durchgeführt.

3.2.3.1 Agardiffusionstest

a) mit *B. subtilis* NCTC 8236

Zum Nachweis von Neomycin-Rückständen wird von SABATH (1972) und SOGARD (1980) *B. subtilis* als Testkeim empfohlen. Bei ARRET et al. (1971) und in den AOAC-METHODEN (1980) werden Testplatten mit *S. epidermidis* verwendet. Die Verarbeitung dieser Platten soll nach Angaben des AOAC (1980) noch am Herstellungstag geschehen. In eigenen Versuchen mit *S. epidermidis* ATCC 12228-Testplatten (hergestellt nach ARRET et al., 1971) wurde die nur kurzfristige Verwendbarkeit bestätigt. Bei nach 2 Tagen bereits stark reduziertem Keimwachstum waren niedrige

Antibiotikakonzentrationen nicht mehr nachweisbar. *B. subtilis*-Platten dagegen zeigten auch nach 3 Wochen keine Beeinträchtigung der Nachweisgrenzen. Da bei der vorliegenden Arbeit die tägliche Herstellung der Testplatten nicht möglich war, kam *B. subtilis* als Testkeim zur Anwendung. Für die Herstellung der *B. subtilis*-Testplatten wurde zunächst eine Sporensuspension nach SABATH (1972) hergestellt. Dazu wird der Testkeim über Nacht in Brain Heart Infusion Broth (Oxoid CM 225) inkubiert. Ca. 3 ml dieser Keimsuspension werden auf der Oberfläche von 300 ml Nährmedium (Nr. 1, Oxoid CM 327) in einer Roux-Flasche verteilt. Nach einer Woche Inkubationszeit bei 37° C werden die Sporen mit 30 ml Aqua dest. abgeschwemmt und anschließend 30 Minuten bei 65° C erhitzt, um die vegetativen Formen abzutöten. Nach dreimaligem Waschen mit sterilem Aqua dest. (Zentrifugieren bei 8000 g 30 Minuten lang) wird der Bodensatz in 20 ml sterilem Aqua dest. resuspendiert und erneut 30 Minuten bei 65° C erhitzt. Nun wird die Suspension nochmals bei 8000 g zentrifugiert und der Bodensatz in 20 ml sterilem Aqua dest. suspendiert. Die so hergestellte Gebrauchssuspension wird bei 4° C aufbewahrt und ist bis zu 6 Monaten haltbar. Die Herstellung des Grundnährbodens für die fertigen Testplatten erfolgte nach der Beschreibung von ARRET et al. (1971) für andere Aminoglykosid-Antibiotika, die im Agardiffusionsverfahren mit *B. subtilis* ATCC 6633 nachgewiesen wurden. Als Nährmedium diente das Antibiotika-Medium Nr.2 (Oxoid CM 335), dem 5 g Agar (Oxoid L 11) pro Liter zugesetzt wurden. Als Lösungsmittel wurde 0,05 M Tris-Puffer (pH 8,0) verwendet (BARBIERS und NEFF, 1967). Nach Zugabe von 6×10^9 Keimen/100 ml auf 55° C abgekühlten Agar (SABATH, 1972) wurden jeweils 10 ml dieses Testmediums in eine Petrischale gegossen. Die mit den Testblättchen beschickten Platten wurden bei 37° C über Nacht inkubiert. Wurde der Testkeim durch Hemmstoffe im Wachstum gehindert, ent-

standen klare Hemmzonen um das Blättchen, während der übrige Agar trüb blieb. Als hemmstoffpositiv galten Hemmzonen von mehr als 1 mm, die mittels Schublehre gemessen wurden. Bei positivem Testergebnis wurden die Milchproben 10 Minuten bei 80°C im Wasserbad erhitzt und dann nochmals angesetzt. Blieben die Hemmhöfe auch nach dem Erhitzen bestehen, wurde den Proben zur Inaktivierung von eventuell vorhandenem Penicillin 10 000 I.E. Penicillinase /ml Milch zugesetzt. Jene Proben, bei denen sich der Hemmstoff als hitzestabil und penicillinasefest erwies, wurden zur weiteren Identifizierung im Dialysiermembranverfahren geprüft. Dabei wurde mit Hilfe einer (für Proteinmoleküle undurchlässigen) Membran nach TERPLAN et al. (1973) untersucht, durch die Penicillin und Neomycin jedoch ungehindert durchdiffundieren konnten. Dazu wurde die Membran nach ausgiebigem Wässern in Aqua dest. in Quadrate geschnitten, deren Kantenlänge wenige Millimeter länger waren als der Blättchendurchmesser (ca. 13 mm). Je Platte wurden zwei Membranquadrate direkt auf die Agaroberfläche aufgelegt und die mit den Milchproben getränkten Blättchen so auf die Membran aufgebracht, daß sie mit der Agaroberfläche nicht in Berührung kamen. Als positive Kontrolle dienten Testblättchen derselben Probe ohne Membranunterlage.

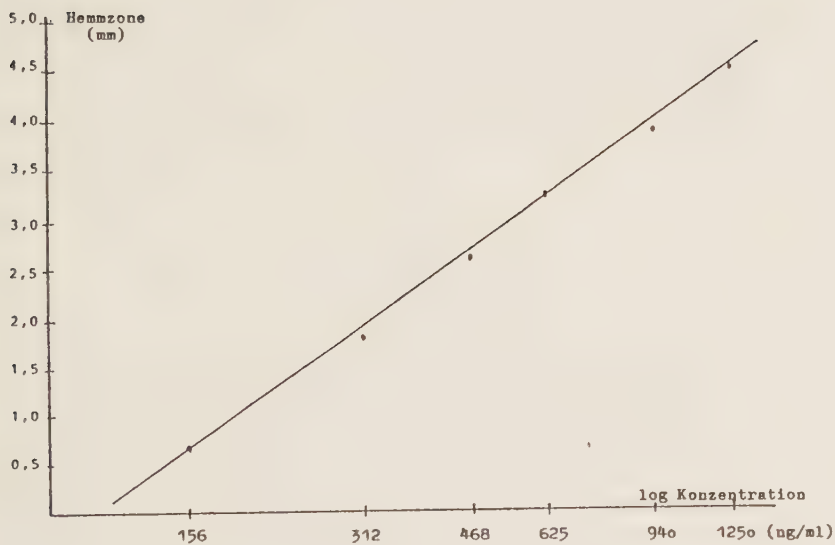
b) Mit *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* C 953

Die Durchführung des Agardiffusionstests erfolgte in Anlehnung an DIN 10 182 Teil 3 (1983) bzw. an die in die amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren aufgenommene Methode L 01.00-18 (BGA, 1980). Als Nachweismedium wurde Plate-Count-Agar verwendet (Oxoid, CM 325), dem die Testkultur bei ca. 55°C im Verhältnis 2 Teile zu 40 Teilen Medium vermischt wurde. Anschließend wur-

de das so hergestellte Testmedium 3,5 mm dick in Petrischalen ausgegossen. Entsprechend den amtlichen Methoden L 01.00-6 (BGA 1980) bzw. der Deutschen Norm DIN 10 182 Teil 1 (1981) wurden Blättchen aus Filterpapier mit einem Durchmesser von 12,7 mm (Schleicher und Schüll Nr. 2668/2) mit den zu untersuchenden Proben getränkt und auf das jeweilige Testmedium aufgelegt. Die Platten wurden bei 55°C für 5 Stunden bebrütet. Ansonsten wurde wie in 3.2.3.1 a beschrieben weiterverfahren.

Zur Erstellung der für die quantitativen Bestimmung der Rückstände erforderlichen Eichkurven wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen Verdünnungsreihen angesetzt. Aus den resultierenden 9 Meßwerten für jede Konzentration wurde der Mittelwert bestimmt und die Regressionsgeraden nach logarithmischer Transformation der Penicillin G bzw. Neomycinsulfat-Konzentrationen berechnet. Dabei wurden Konzentrationsbereiche von 0,0075-0,1 µg Penicillin/ml bzw. 0,156-1,25 µg Neomycin/ml gewählt. Die Konzentrationswerte sind in Abb.1 und 2 auf der Abszisse logarithmisch aufgetragen. Als Nachweisgrenzen wurden für Penicillin G auf *B. stearothermophilus* var. *calidolactis*-Platten eine Konzentration von 0,005 µg Penicillin/ml (= 0,0077 I.E./ml) und auf *B. subtilis*-Testplatten eine Konzentration von 0,15 µg Neomycin/ml ermittelt.

Abbildung 1: Neomycin-Eichkurve

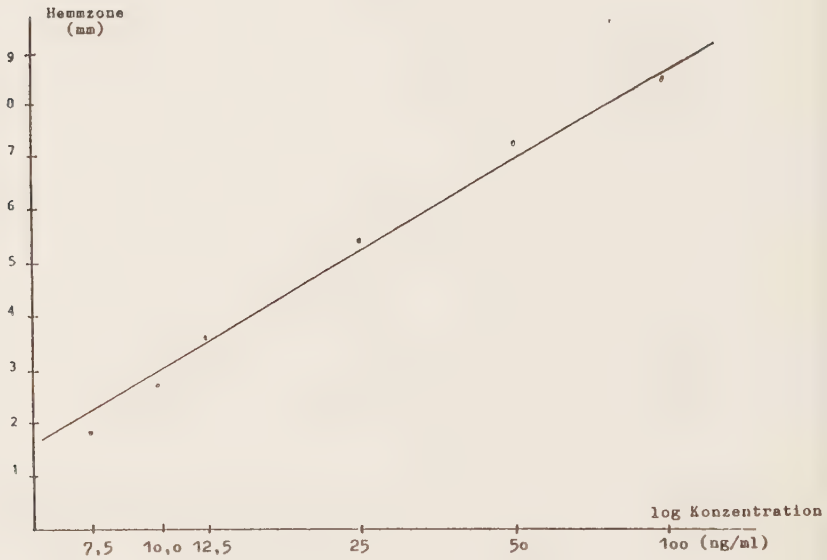


Gleichung der Regressionsgeraden:

$$y = -8,99 + 4,362 x$$

$$r = 0,9983$$

Abbildung 2: Penicillin-G - Eichkurve



Gleichung der Regressionsgeraden:

$$y = -3,45 + 6,219 x$$

$$r = 0,9964$$

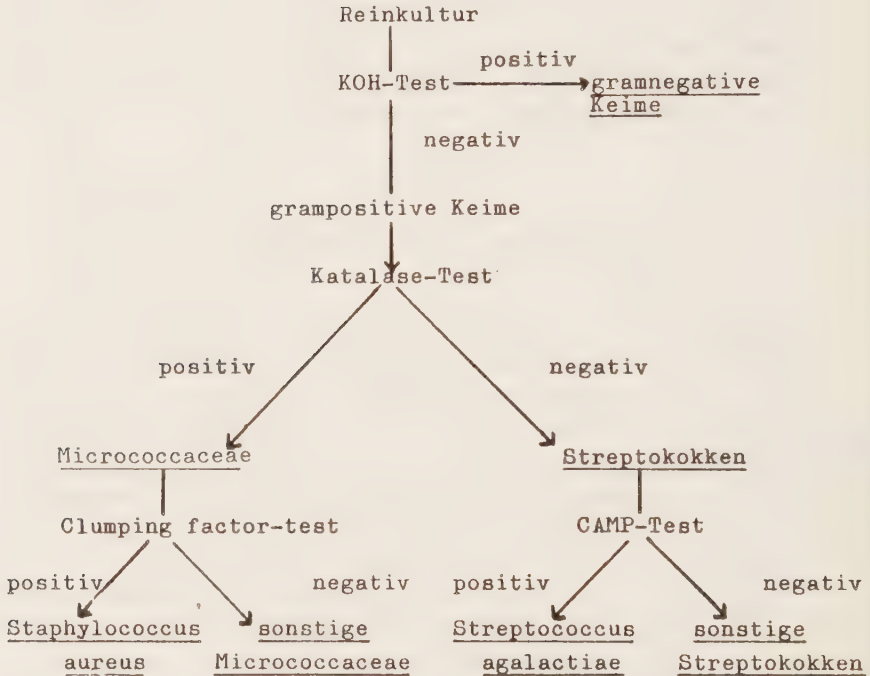
3.2.3.2 Brillantschwarz-Reduktionstest

Für die Durchführung des Brillantschwarz-Reduktionstests (BRT) wurden gebrauchsfertige Tabletts mit den dazu gehörigen Kontrollen freundlicherweise von der Landesvereinigung der Bayerischen Milchwirtschaft zur Verfügung gestellt. Die Beschickung der BRT-Tabletts, Inkubation und Auswertung erfolgten nach den Vorschriften der Deutschen Norm DIN 10 182 Teil 2 (1982) bzw. der amtlichen Methode L 01.00-11 gemäß § 35 LMBG (1980).

3.2.4 Bakteriologische Untersuchung

Zur Ermittlung von euterpathogenen Mikroorganismen vor und nach der Verabreichung des Trockenstillers Mastitar^R forte wurden Viertelgemelksproben vom letzten Melken vor dem Trockenstellen bzw. vom 6. Tag nach dem Abkalben bakteriologisch untersucht. Hierzu wurden die Proben mit einer standardisierten Platinöse (0,02 ml) auf Blutagarplatten ausgestrichen. Zur Herstellung der Platten wurde dem Grundnährboden (Columbia Agar Basis, Oxoid CM 331) 6 % gewaschene Rindererythrozyten (DVG, 1980) zugesetzt, außerdem zur besseren Unterscheidung der Streptokokken 0,1 % Äskulin (Merck, 848). Auf eine Platte wurden vier Viertelgemelke ausgestrichen. Die Bebrütung erfolgte 48 Stunden bei 37° C. Weniger als fünf gewachsene Kolonien wurden als vereinzelttes Keimwachstum, mehr als fünf gleichartige Kolonien pro Ausstrich (das entspricht > 250 Keime/ml) als starkes Keimwachstum gewertet. Zur groben Differenzierung verdächtiger Mastitiserreger wurden die Kolonien nach dem in Übersicht 1 gezeigten Schema untersucht.

Übersicht 1: Schema zur "Grob-differenzierung" von aus Viertelgemelken isolierten Keimen



Zur Differenzierung grampositiver und gramnegativer Keime wurde zunächst der KOH-Test (GREGERSEN, 1978) durchgeführt. Dazu wurde etwas Material der zu untersuchenden Kolonie mit einer Öse auf einen Objektträger verbracht und dort in einem Tropfen 3 %iger KOH 5-10 Sekunden verrieben. Bei positiver Reaktion (d.h. gramnegative Keimart) kommt es zu einer Viskositätserhöhung der KOH-Lö-

sung. Beim Abheben der Öse vom Objektträger folgt dieser ein schleimiger Faden. Bleibt die KOH-Lösung degegen flüssig, handelt es sich um grampositive Keime. Gramnegative Keime wurden nicht weiterdifferenziert, während grampositive Keime durch Prüfung auf Katalase den Streptokokken oder der Familie der Micrococcaceae zugeordnet wurden. Hierzu wurde etwas Material der zu untersuchenden Kolonie in einen Tropfen 3 %igem H_2O_2 eingegeben. Bei Schaumbildung handelte es sich um Keime der Familie der Micrococcaceae. Die weitere Unterscheidung zwischen sonstigen Micrococcaceae und Staphylococcus (S.) aureus erfolgte im sogenannten Clumping factor-test (DVG, 1980). Dazu wurde das zu testende Material auf einem Objektträger mit Zitratplasma von Kaninchen oder Schwein vermischt. Bei Verklumpung der Bakterienmasse wurde die Keimart der Spezies S. aureus zugeordnet, blieb das Gemisch homogen, wurde die Keimart neben anderen grampositiven, katalasepositiven Keimen zu den sonstigen Micrococcaceae gezählt. Um Spontanagglutinationen auszuschließen, wurde als Kontrolle jeweils parallel statt des Kaninchen- oder Schweineplasmas physiologische NaCl-Lösung verwendet. Bei Verdacht auf S. agalactiae (grampositiv, katalasenegativ, äskulinnegativ) wurde zur Absicherung der CAMP-Test (CHRISTIE, ATKINS und MUNCH-PETERSEN, 1944) durchgeführt. Der CAMP-Test, der von SEELEMANN und OBIGER (1956) in Deutschland eingeführt worden war, wurde in Anlehnung an die von der DVG (1980) festgelegten bzw. nach der in den amtlichen Methoden gemäß § 35 LMBG vorgeschriebenen Methodik (z.Zt. im Druck) durchgeführt. Zur Herstellung der verwendeten Blutplatten diente als Grundnährboden DST-Agar (Oxoid CM 261), der mit 6 % gewaschenen Rindererythrozyten sowie 0,1 % Äskulin versetzt wurde. Bei Vorliegen des CAMP-Phänomens (schalen-, halbmond- oder trichterförmige Hämolyse)

lyse im Bereich der β -Toxin-Zone des *S. aureus*-Teststammes) sprach dies für *S. agalactiae*. Bei Fehlen dieser typischen Hämolyseform wurden die Keime den sonstigen Streptokokken zugeordnet.

3.2.5 Zytologische Untersuchungen

3.2.5.1 California-Mastitis-Test (CMT)

Nach Reinigung des Euters wurde das Vorgemelk jedes Euterviertels in eine Schalm-Test-Schale gemolken. Um die erforderliche Milchmenge von etwa 2 ml zur Durchführung des Tests zu erhalten, wurde die überschüssige Milch abgekippt. Anschließend wurden die Proben im Verhältnis 1:1 mit der Testflüssigkeit (Iffa Merieux) versetzt und unter kreisförmiger Bewegung vermischt. Die Auswertung erfolgte während dieser Bewegung nach dem Schlüssel von SCHALM (1960) (Übersicht 2).

Übersicht 2: Beurteilungsschlüssel für den California-Mastitis-Test (CMT)

Abkürzung	Bedeutung	Konsistenz	Zellgehalt /ml
-	negativ	unverändert	$0,0 - 2 \cdot 10^5$
±	zweifelhaft	leichte Schlierenbildung, die sich aber wieder auflöst	$1,5 - 5,5 \cdot 10^5$
+	schwach positiv	teilweise noch reversible, verstärkte Schlierenbildung, jedoch noch keine Gelbildung	$0,4 - 1,5 \cdot 10^6$
++	deutlich positiv	Schleimbildung bzw. geringgradige Gelbildung, Mischung fließt noch	$0,8 - 5 \cdot 10^6$
+++	stark positiv	Konsistenz zäh-schleimig, Gelbildung, konvexe Oberfläche der Mischung	$5 \cdot 10^6$

3.2.5.2 Mikroskopische Untersuchung ("Kieler Sedimentausstrichverfahren")

Dieses Verfahren wurde nach den Angaben der METHODEN-KOMMISSION (1960) durchgeführt. Die zu untersuchenden Viertelgemelksproben wurden 10 Minuten bei ca. 3 000 U/Minute zentrifugiert und mit einer Öse (ϕ 2 mm) etwas Sediment in 1-2 Tropfen Wasser auf einem entfetteten Objektträger so ausgestrichen, daß eine ovale Fläche von ca. 3 cm² bedeckt war. Nach Lufttrocknung und Hitzefixation wurde das Präparat mit einer 0,5 % igen Methylenblaulösung 5 Minuten lang gefärbt. Die Auswertung des Ausstrichs erfolgte mittels Ölimmersion nach Art und Menge der Zellen sowie Phagozytose von Keimen in Anlehnung an das von OBIGER (1962) beschriebene Schema (s.Übersicht 3).

Übersicht 3: Schema zur Beurteilung des Sedimentausstrichs

Befund	Beurteilung
1-5 Zellen / Gesichtsfeld	normaler Zellgehalt
5 Zellen / Gesichtsfeld	erhöhter Zellgehalt
Zellen unzählbar, größere Zellanhäufungen, Zellkonglomerate	Sekretionsstörung (vermehrter Zellgehalt ohne gleichzeitiges Auftreten von pathogenen Keimen) bzw. mikroskopisch nachweisbarer Eiter

3.3 Ergebnisse

Drei der 113 trockengestellten Kühe schieden wegen antibiotischer Mastitisbehandlung aus dem Versuch aus. Bei zwei Tieren wurde die Kalbung vom Tierbesitzer nicht gemeldet. Es konnten also nur 108 Kühe in die Auswertung einbezogen werden. Bei den meisten Tieren (93 Tiere, entsprechend 86,1 %) dauerte die Trockenperiode zwischen 35 und 80 Tagen. 11 Kühe (10,1 %) standen zwischen 81 und 115 Tagen trocken, 4 Kühe kalbten früher als erwartet ab, die Laktationspause dauerte bei ihnen nur 23-34 Tage (Tabelle 5).

Tabelle 5: Dauer der Laktationspause der in die Auswertung einbezogenen 108 Kühe

Laktationspause (in Tagen)	Anzahl der Kühe (%)	
23-34	4	(3,7)
35-40	16	(14,8)
41-50	34	(31,5)
51-60	18	(16,7)
61-70	13	(12,1)
71-80	12	(11,1)
81-100	6	(5,5)
101-115	5	(4,6)

3.3.1 Untersuchungen auf Hemmstoffe

3.3.1.1 Vor dem Trockenstellen

Vor dem Trockenstellen wurden die Viertelgemelksproben von 92 Tieren (entsprechend 367 Proben, eine Kuh war dreistrichig) mit *B. subtilis* als Testkeim auf Hemmstoffe untersucht. Nur bei einer Viertelgemelksprobe war der Hemmstofftest auch nach dem Erhitzen auf 80° C für 10 Minuten noch positiv. Die Größe der Hemmzone betrug jeweils 1,8 mm.

3.3.1.2 Nach dem Kalben

Am 6.Tag p.p. wurden 431 Viertelgemelksproben von 108 Kühen auf Antibiotikarückstände untersucht. Bei 379 Viertelgemelksproben von 95 dieser Tiere wurde die Untersuchung am 7. Tag p.p. wiederholt. Bei 104 Tieren (entsprechend 415 Viertelgemelksproben) war am 6. Tag p.p. die gesetzliche Wartezeit abgelaufen. 4 Tiere wurden weniger als 35 Tage vor dem Zeitpunkt der Geburt mit dem Trockensteller behandelt, die Laktationspause dauerte nur 23, 25, 31 bzw. 34 Tage, sodaß somit die gesetzliche Wartezeit von 40 Tagen p.p. noch nicht abgelaufen war. Auch von diesen Tieren wurden am 6. und 7. Tag p.p. Viertelgemelksproben auf Hemmstoffe untersucht. Die Untersuchungen erfolgten sowohl mit *B. subtilis* (NCTC 8236) als auch mit *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* (C 953) als Testkeime.

a) Agardiffusionsverfahren mit *B. subtilis* (NCTC 8236)

Mit diesem Testkeim wurde am 6. Tag p.p. in 9 und am 7. Tag p.p. in 4 Viertelgemelksproben Hemmstoffe nachgewiesen. Nach Erhitzen, Penicillinasezugabe und Membrandiffusionsmethode waren noch 7 Proben vom 6. Tag p.p. und 2 Proben vom 7. Tag p.p. positiv (Tabelle 6).

Tabelle 6: Ergebnisse der Hemmstoffuntersuchung mit *B. subtilis* NCTC 8236 am 6. und 7. Tag p.p.

	6. Tag p.p.	7. Tag p.p.
Anzahl der untersuchten Proben (Anteil)	431 (100%)	379 (100%)
davon hemmstoffpositiv	9 (2,1%)	4 (1,1%)
nach Erhitzen	7 (1,6%)	4 (1,1%)
nach Penicillinasezugabe	7 (1,6%)	4 (1,1%)
Diffusion durch Membran	7 (1,6%)	2 (0,5%)

Die positiven Viertelgemelksproben vom 6. Tag p.p., die auch durch die Membran hindurch einen Hemmhof verursachten, stammten von 2 Kühen, wobei je ein

Viertelgemelk auch am nächsten Tag positiv blieb. Eine Aufstellung über die einzelnen hemmstoffhaltigen Viertelgemelke und die Dauer der Laktationspause bei den betreffenden Kühen zeigt Tabelle 7.

Tabelle 7: Nachweis von hitzestabilen penicillinasefesten Hemmstoffen, die auch durch die Membran diffundierten, in den Viertelgemelken unter Berücksichtigung der Laktationspausen der betreffenden Tiere

Dauer der Laktationspause in Tagen		6. Tag p.p.	7. Tag p.p.
1. Kuh	38	ABCD) ^x	-
2. Kuh	42	ABC) ^x	A) ^x
3. Kuh	76	-	A) ^x

)^x: A = rechtes Vorderviertel
B = rechtes Hinterviertel
C = linkes Vorderviertel
D = linkes Hinterviertel

b) Agardiffusionsverfahren mit *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* (C 953)

In diesem Testverfahren waren am 6. Tag p.p. Hemmstoffe in 36 Viertelgemelken nachweisbar. Nach Erhitzen blieben 29 hemmstoffpositiv. In 4 dieser Proben, bei denen die Hemmzonengröße zwischen 9,5 und 10,0 mm lag, wurde die Hemmwirkung durch Penicillinasezugabe aufgehoben. Die Hemmstoffe aus den übrigen 25 Proben diffundierten nicht durch die Membran.

Am 7. Tag p.p. waren 24 Viertelgemelksproben hemmstoffhaltig. Von den 17 hitzestabilen Proben erwiesen sich 4 als Penicillinase-empfindlich. Es handelte sich dabei um Proben einer Kuh, in deren Viertelgemelksproben auch schon am Vortag hitzestabile, Penicillinase-empfindliche Hemmstoffe nachgewiesen worden waren. Die Größe der Hemmzonen am 7. Tag p.p. betrug 1,7 - 2,7 mm. Von den übrigen Proben blieb nach den drei Ausschlußverfahren nur eine Probe hemmstoffpositiv (Tabelle 8). Mit *B. subtilis* als Testkeim waren allerdings in dieser Probe keine Hemmstoffe nachweisbar gewesen. Die Hemmzonengröße dieser Probe lag bei 4,4 mm.

Tabelle 6: Ergebnisse der Hemmstoffuntersuchung
mit *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* am 6. und 7. Tag p.p.

	6. Tag p.p.	7. Tag p.p.
Anzahl der untersuchten Proben	431 (100%)	379 (100%)
davon hemmstoffpositiv	36 (8,4%)	24 (6,3%)
nach Erhitzen hemmstoffpositiv	29 (6,7%)	17 (4,5%)
nach Penicillinasezugabe hemmstoffpositiv	25 (5,8%)	13 (3,4%)
Diffusion durch Membran	- (0,0%)	1 (0,3%)

c) Brillantschwarz-Reduktionstest (BRT)

22 Proben vom 6. Tag p.p. sowie 12 Proben vom 7. Tag p.p. reagierten im BRT positiv (1. Ansatz). In einem doppelten Wiederholungsansatz derselben Proben (2. und 3. Ansatz) waren nur noch in 5 Proben vom 6. Tag und 4 Proben vom 7. Tag bzw. 4 Proben vom 6. Tag und 3 Proben vom 7. Tag Hemmstoffe nachweisbar. Bei einer nochmaligen Untersuchung im Agardiffusionstest mit *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* wurden in 18 Proben vom 6. Tag p.p. bzw. 8 Proben vom 7. Tag p.p., die zuvor schon mit diesem

Testverfahren, sowie auch im Agardiffusionstest mit *B. subtilis* als Testkeim für hemmstofffrei befunden worden waren, keine Hemmstoffe nachgewiesen.

3.3.2 Untersuchungen auf Eutergesundheit

3.3.2.1 Vor dem Trockenstellen

a) Zytologische Untersuchungen

84 (19,5 %) der insgesamt 431 im CMT untersuchten Viertelgemelksproben zeigten ein positives Testergebnis (Tabelle 7).

Tabelle 7: Ergebnisse der im CMT bei 431 vor dem Trockenstellen geprüften Viertelgemelksproben

Reaktion im CMT	Anzahl der Proben (%)	

-	343	(79,6)
+/-	4	(0,9)
+	71	(16,5)
++	12	(2,8)
+++	1	(0,2)

Der Anteil der Tiere, bei denen auf mindestens einem Euterviertel der CMT positiv ausfiel, betrug 34,3%, entsprechend 37 Kühen (Tabelle 8).

Tabelle 8: Anzahl der CMT-positiven Viertel je Kuh bei 108 Kühen vor dem Trockenstellen

Anzahl der CMT-positiven Viertel / Kuh	Anzahl der Kühe	(%)
0	71	(65,7)
1	14	(13,0)
2	8	(7,4)
3	6	(5,6)
4	9	(8,3)

Von den CMT-positiven Proben, bei denen zur weiteren Untersuchung Kieler Ausstriche angefertigt wurden, zeigten 71 Viertelgemelke (84,5%) ebenfalls einen erhöhten Zellgehalt. 13 Proben wiesen einen normalen Zellgehalt auf (Tabelle 9). Der Prozentsatz der Viertelgemelke mit mikroskopisch nachweisbar erhöhtem Zellgehalt aller entnommenen Proben betrug demnach nur 16,5%.

Tabelle 9: Befunde des Kieler Ausstrichverfahrens bei
84 vor dem Trockenstellen entnommenen,
CMT-positiven Viertelgemelksproben

Befunde im Kieler Ausstrichverfahren	Anzahl der Viertelgemelke (%)
normaler Zellgehalt	13 (15,5)
erhöhter Zellgehalt	41 (48,8)
Sekretionsstörung, mikroskopisch nach- weisbarer Eiter	30 (35,7)

In allen Ausstrichen mit erhöhtem Zellgehalt wurden Epithelzellen und Granulozyten, sehr selten Lymphozyten und Monozyten gefunden. Bei sehr hohem Zellgehalt waren die Zellen nur schwer zu differenzieren, da sie dann meist zu Konglomeraten zusammengeballt waren. In 14 Fällen (16,7 %) konnten auch Keime registriert werden.

b) Bakteriologische Untersuchungen

Aus 32 der 71 Viertelgemelksproben, die im Kieler Ausstrichverfahren einen erhöhten Zellgehalt aufwiesen, wurden vermehrt (>250 Keime/ml Milch) euterpathogene oder potentiell pathogene Mikroorganismen isoliert.

Bei den Erregern handelte es sich vorwiegend um "sonstige Streptokokken" und "sonstige Micrococcaceae". In zwei Proben wurde *S. aureus* nachgewiesen, in vier *S. agalactiae* und in einer gramnegative Keime (Tabelle 10). Bei Kühen, die auf mehreren Vierteln bakteriologisch positiv waren, wurde bis auf eine Ausnahme auf allen betroffenen Vierteln jeweils die selbe Keimart ermittelt.

Tabelle 10: Kultureller Nachweis von euterpathogenen Mikroorganismen (>250 Keime/ml) in 32 unter aseptischen Bedingungen gewonnenen Viertelgemelksproben mit erhöhtem Zellgehalt

Euterpathogene Mikroorganismen	Anzahl der Viertelgemelke	(%)
<i>S. aureus</i>	2	(6,2)
sonst. Micrococcaceae	11	(34,4)
<i>S. agalactiae</i>	4	(12,5)
sonst. Streptokokken	14	(43,8)
Gramnegative	1	(3,1)

Die 32 Viertelgemelksproben stammten von insgesamt 19 Tieren. Bei 15 dieser Kühe wurden kulturell positive Proben ausschließlich in Vierteln mit erhöhtem Zellgehalt gefunden. Eine Aufstellung über die Häufigkeit kulturell positiver Viertelgemelke bei den einzelnen Tieren zeigt Tabelle 11. Bei den restlichen vier Kühen wurden euterpathogene Mikroorganismen in vier Vierteln mit und sechs Vierteln ohne Zellgehaltserhöhung nachgewiesen.

Tabelle 11: Anzahl der kulturell positiven Viertelgemelke je Kuh bei Tieren mit erhöhtem Zellgehalt

Anzahl der Viertel- gemelke je Kuh	Anzahl Kühe	Viertelgemelks- proben insgesamt
1	9	9
2	2	4
3	1	3
4	3	12

In den 360 Viertelgemelken mit normalem Zellgehalt konnten bei 23 Kühen 35 mal kulturell Keime nachgewiesen werden. Es handelte sich hauptsächlich um "sonstige Streptokokken" und "sonstige Micrococcaceae" (Tabelle 12).

Tabelle 12: Kultureller Nachweis von euterpathogenen Mikroorganismen (>250 Keime/ml Milch) in unter aseptischen Bedingungen entnommenen Viertelgemelksproben mit normalem Zellgehalt

Euterpathogene Mikroorganismen	Anzahl der Viertelgemelke	(%)
S. aureus	5	(14,3)
sonstige Micrococcaceae	14	(40,0)
S. agalactiae	0	(0,0)
sonstige Streptokokken	16	(45,7)
Gramnegative	0	(0,0)

Bei vier dieser 23 Kühe handelt es sich um die bereits beschriebenen Tiere, die sowohl in Viertelgemelken mit normalem als auch in solchen mit erhöhtem Zellgehalt vor dem Trockenstellen vermehrt euter-

pathogene Mikroorganismen aufwiesen. Eine Aufstellung über die Verteilung der positiven Viertel bei den restlichen Tieren zeigt Tabelle 13. In den meisten Fällen (13 Kühe) war nur ein Viertel betroffen.

Tabelle 13.: Anzahl der kulturell positiven Viertelgemelke je Kuh mit normalem Zellgehalt

Anzahl der Viertel	Anzahl Kühe	positive Viertelgemelksproben
1	13	13
2	3	6
3	2	6
4	1	4

3.3.2.2 Nach dem Kalben

Am 6. Tag p.p. wurden in 20 der 431 Viertelgemelksproben (4,6 %) von 13 Kühen, die klinisch nicht erkrankt waren, kulturell euterpathogene oder potentiell pathogene Erreger nachgewiesen. Ein Vergleich der bakteriologischen Ergebnisse der vor dem Trockenstellen und nach dem Kalben entnommenen Proben zeigt Ta-

belle 14. Die Verteilung der kulturell positiven Viertelgemelke je Kuh nach dem Kalben wird in Tabelle 15 wiedergegeben.

Tabelle 14: Kultureller Nachweis von euterpathogenen Mikroorganismen (> 250 Keime/ml) in 20 unter aseptischen Bedingungen entnommenen Viertelgemelksproben am 6. Tag p.p., im Vergleich mit den vor dem Trockenstellen entnommenen Proben

Euterpathogene Mikroorganismen	Anzahl der positiven Viertelgemelke		
	Vor dem Trockenstellen	p.p.	
	Zellgehalt erhöht	Zellgehalt normal	
S. aureus	2	5	3
sonst. Micro- coccaceae	11	14	12
S. agalactiae	4	-	-
sonst. Strepto- kokken	14	16	5
Gramnegative	1	-	-
insgesamt:	32	35	20

Tabelle 15: Häufigkeit kulturell positiver Viertel je Kuh nach dem Kalben

Anzahl der positiven Viertelgemelke/Kuh	Anzahl der Kühe	Anzahl der positiven Viertel
1	9	9
2	2	4
3	1	3
4	1	4
insgesamt :	13	20

Im Vergleich Befunden der insgesamt 67 kulturell positiven Viertel (mit normalem und erhöhtem Zellgehalt) vor dem Trockenstellen, wurden nur noch bei einer Kuh auf einem Euterviertel auch nach dem Kalben noch euterpathogene Keime nachgewiesen. Dabei handelte es sich sowohl vor dem Trockenstellen wie auch nach dem Kalben um *S. aureus*. Alle anderen 66 Viertel waren p.p. bakteriologisch unauffällig. Bei 19 Vierteln jedoch, die vor dem Trockenstellen kulturell negativ waren, wurden nach der Kalbung vermehrt Keime nachgewiesen (Tabelle 16). Drei der ursprünglich trockengestellten Kühe wurden wegen antibiotischer Mastitisbehandlung nicht

mit in die Auswertung miteinbezogen. Diese Tiere waren in der bakteriologischen Untersuchung vor dem Trockenstellen negativ und erkrankten während der Laktationspause bzw. nach dem Kalben auf jeweils einem Euterviertel an einer akuten Mastitis. In allen Fällen wurden "sonstige Streptokokken" aus den betreffenden Eutervierteln isoliert. Eine Übersicht über Dauer der Laktationspause, Tag der Erkrankung und bakteriologischen Befund gibt Tabelle 17 wieder.

Tabelle 16: Bakteriologischer Befund der Euterviertel am 6. Tag p.p. unter Berücksichtigung der bakteriologischen Befunde vor dem Trockenstellen

	Vor dem Trocken- stellen	geblie- ben	neu ent- standen
S. aureus	7	1	2
sonst. Micro- coccaceae	25	0	12
S. agalactiae	4	0	0
sonst. Strepto- kokken	30	0	5
Gramnegative	1	0	0
insgesamt:	67	1	19

Tabelle 17: Kühe, die während der Versuchszeit an Mastitiden erkrankten

	Dauer der Laktations- pause	Tag der Erkran- kung	bakterio- logischer Befund
Kuh 1	92 Tage	3 Tage p.p.	"sonstige Streptokok- ken"
Kuh 2	35 Tage	6 Tage p.p.	"sonstige Streptokok- ken"
Kuh 3	82 Tage	27 Tage a.p.	"sonstige Streptokok- ken"

4 Besprechung der Ergebnisse und Diskussion

Unter "Trockenstellen" versteht man in der Milchtierhaltung, daß es durch Einstellen des Melkens zunächst zu einer Reduktion und schließlich zu einem gänzlichen Sistieren der Milchsekretion kommt.

In den ersten drei Wochen nach dem Trockenstellen sowie ausgangs der Trockenperiode und um den Abkalbetermin treten relativ häufig Störungen der Eutergesundheit auf (TOLLE, 1983). Nach dem Kalben haben normalerweise mehr Kühe infizierte Euter als zur Zeit des Trockenstellens (SMITH et al., 1966, 1967 b). Deshalb wird das Trockenstellen häufig unter Antibiotikaschutz vorgenommen. Das antibiotische Trockenstellen wird von vielen Autoren zur Reduzierung bereits bestehender, subklinischer Mastitiden empfohlen (KINGWILL et al., 1970; EBERHART und BUCKALEW, 1972; DANNEMANN, 1973; NATZKE et al., 1974). Weil die Behandlung während der Laktation unwirtschaftlich ist, stellt die Trockenperiode eine vergleichsweise günstige Situation dar, da in dieser Zeit keine Milch produziert wird und im allgemeinen - im Hinblick auf den Übergang der Wirkstoffe in den gesamten Organismus, also auch ins Fleisch - auch nicht mit einer Schlachtung der Tiere zu rechnen ist (TERPLAN et al., 1979).

Von mehreren Autoren wurden Untersuchungen über die Ausscheidungsdauer von verschiedenen Antibiotika in Kolostralmilch bzw. Sekret vom trockenstehenden Euter nach medikamentellem Trockenstel-

len durchgeführt. Nach den Ergebnissen dieser Arbeiten sind nach einmaliger antibiotischer Versorgung des Euters zum Zeitpunkt des Trockenstellens normalerweise keine Antibiotika in der Kolostralmilch nachweisbar (ZIV et al., 1973; JOHNSON et al., 1977; DE MARIA et al., 1980; OLIVER et al., 1984).

In der letzten Zeit häuften sich jedoch Berichte aus der Praxis über Antibiotika-Rückstände in der Milch von Kühen, die mit einem Oxacillin-haltigen Präparat trockengestellt worden waren (TERPLAN, 1984; BUFF, 1986). Es war daher von Interesse zu ermitteln, ob ähnliches auch von einem Präparat mit einer Penicillin-Neomycin-Kombination zu erwarten wäre. Insbesondere sollte untersucht werden, ob die vom Hersteller angegebene Wartezeit des Präparates, die bei Tieren, die früher als 35 Tage vor dem Zeitpunkt der Geburt behandelt wurden, bis einschließlich 5 Tage nach Laktationsbeginn und bei später behandelten Tieren 40 Tage post applicationem beträgt, ausreichend ist. Außerdem wurde die Wirksamkeit des Präparats auf die Eutergesundheit geprüft.

Die Auswahl der Versuchstierbestände und der Tiere selbst erfolgte rein zufällig. Nach der Probenentnahme und der Applikation des Trockenstellers erfolgte keine weitere Behandlung des Euters. Am 6. und 7. Tag nach Laktationsbeginn wurden die Viertelgemelke auf Antibiotika-Rückstände untersucht.

Vor dem Trockenstellen war nur eine Viertelgemelkprobe auch nach deren Erhitzen hemmstoffpositiv, ohne daß dafür eine Erklärung gefunden werden konnte.

Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den Befunden von NEUMANN-PAULITSCHKE (1987), die in 7,7 % der Viertelgemelksproben von insgesamt 131 trockengestellten Kühen auch nach dem Erhitzen Hemmstoffe nachwies. Als Ursache vermutet NEUMANN-PAULITSCHKE eine saisonbedingte Bakterizidie der Milch, da fast alle hitzeresistenten Hemmstoffe in einem Zeitraum von nur 25 Tagen auftraten, in dem die Futterumstellung von Grün- auf Winterfutter erfolgte.

In der vorliegenden Arbeit wurden bei 10 Kühen, die ebenfalls zur Zeit des Futterwechsels trocken-gestellt wurden, jedoch keine hitzeresistenten Hemmstoffe nachgewiesen. Es ist deshalb anzunehmen, daß sich in dem Gebiet, aus dem die in den Versuch einbezogenen Tiere stammen, keine vergleichbare saisonale Bakterizidie der Milch ausbildet.

Ursache dafür wäre möglicherweise eine andere Zusammensetzung der Futterration. Da die hügelige Lage des Schwarzwaldes Ackerbau nur in sehr beschränktem Maße zuläßt, werden die Kühe hier hauptsächlich mit Gras, Heu, in der Regel Kraftfuttermischung und teilweise auch mit Grassilage, Mais und Maissilage gefüttert.

Nach dem Kalben wurde im Agardiffusionsverfahren mit *B. subtilis* in 9 Viertelgemelksproben (entsprechend 2,1 %) vom 6. Tag p.p. und in 4 Viertelgemelksproben (entsprechend 1,1 %) vom 7. Tag p.p. Hemmstoffe nachgewiesen (s. Ergebnisteil 3.3.1.2 a).

Durch Erhitzen der Proben wurden die Hemmstoffe in 2 Viertelgemelksproben einer Kuh vom 6. Tag p.p. zerstört. Es ist daher anzunehmen, daß es sich bei diesen Substanzen um unspezifische Hemmstoffe und

nicht um Antibiotika handelte.

Die Hemmstoffe der übrigen Proben erwiesen sich als hitzestabil und waren auch nach Zugabe von Penicillinase noch nachweisbar, weshalb β -Laktam-Antibiotika als Ursache ausgeschlossen werden können, bzw. nicht als einzige Hemmstoffe in Frage kommen. Um abzuklären, ob es sich bei ihnen um Antibiotika handelte, wurden die Proben im Dialysiermembranverfahren getestet. Bis auf 2 Proben vom 7. Tag p.p. diffundierten alle durch die Membran. Es bleiben also 7 Proben vom 6. Tag und 2 Proben vom 7. Tag (entsprechend 1,6 bzw. 0,5 %) übrig, bei denen die Molekulargröße, nach der Diffusion durch die Membran zu urteilen, deutlich unter der von Hühnereiweißlysozym liegt, was für Antibiotika spricht. Da diese Hemmstoffe mit *B. subtilis* nachgewiesen wurden, während sich mit *B. stearothermophilus* var. *caldolactis* keine Hemmhöfe bildeten, liegt die Vermutung nahe, daß es sich hierbei um Neomycin handelt, zumal dieses Antibiotikum auch im Trockensteller enthalten war und die Verabreichung eines anderen Antibiotikums während der Versuchszeit ausgeschlossen werden kann. Eine Bestätigung durch ein spezifisches Referenzverfahren war aus technischen Gründen leider nicht möglich.

Die 7 positiven Viertelgemelksproben vom 6. Tag p.p. stammten von 2 Kühen, deren Laktationspause 38 bzw. 42 Tage dauerte. Ein Viertelgemelk der Kuh mit der 42-tägigen Laktationspause blieb auch am folgenden Tag noch positiv, während in den Proben der anderen Kuh keine Hemmstoffe mehr nachzuweisen waren.

Die zweite am 7. Tag p.p. positive Milchprobe stammte von einer Kuh mit einer 76-Tage dauernden Laktationspause, bei der am 6. Tag p.p. keine Hemmstoffe

nachzuweisen waren. Dieses Phänomen, das auch in den Arbeiten von MOL et al. (1970) und FEUERSTEIN (1987) beschrieben wurde, gibt den Hinweis, daß die Neomycin-Ausscheidung möglicherweise nicht kontinuierlich erfolgen muß.

Mit *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* als Testkeim waren 36 Viertelgemelke (entsprechend 8,4 %) am 6. Tag p.p. und 24 Viertelgemelke (entsprechend 6,3 %) vom 7. Tag p.p. hemmstoffpositiv (s. Ergebnisteil 3.3.1.2 b).

Bei 19 Proben wurden Hemmstoffe sowohl am 6. als auch am 7. Tag p.p. nachgewiesen. Bei 3 Kühen waren in 6 Viertelgemelksproben nach dem Erhitzen an beiden Tagen keine Hemmstoffe mehr nachzuweisen. Ebenso erwiesen sich die Hemmstoffe jeweils einer weiteren Probe vom 6. und 7. Tag p.p. als hitzelabil und sind somit als unspezifisch einzustufen.

Bei allen anderen Proben (29 vom 6. und 17 vom 7. Tag p.p.) blieben die Hemmstoffe auch nach dem Erhitzen erhalten. Durch Penicillinasezugabe wurden die Hemmhöfe bei allen 4 Viertelgemelksproben vom 6. und 7. Tag p.p. einer Kuh aufgehoben. Es ist deshalb anzunehmen, daß es sich bei ihnen um Penicillin oder um andere β -Laktam-Antibiotika handelte. Am 6. Tag p.p. lag die Penicillinkonzentration - bzw. die Penicillinäquivalente - entsprechend der aufgestellten Eichkurve zwischen 0,15 und 0,3 I.E./ml und am 7. Tag p.p. bei 0,015 I.E./ml. Alle Viertelgemelksproben vom 6. Tag p.p. sowie 3 Proben vom 7. Tag p.p. reagierten auch im Brillantschwarz-Reduktionstest hemmstoffpositiv. Die Trockenperiode dieser Kuh dauerte 51 Tage, die Wartezeit war demnach abgelaufen.

Bei allen übrigen Proben (25 vom 6. und 13 vom 7. Tag p.p.) erfolgte keine Beeinflussung der Hemmwirkung durch Penicillinase, was gegen das Vorliegen von

β -Laktam-Antibiotika spricht. Beim Dialysiermembran-Diffusionstest vermochten nur die Hemmstoffe einer Probe einer Kuh, deren Laktationspause 36 Tage betrug, durch die Membran zu diffundieren. Nachdem sich im Agardiffusionstest mit *B. subtilis* kein Hemmhof gebildet hatte, ist anzunehmen, daß es sich nicht um Neomycin handelte und der Hemmstoff damit nicht aus dem Trockensteller stammt. Da die Kuh während des Versuchs unter eigener tierärztlicher Kontrolle stand, können evtl. applizierte hemmstoffhaltige Arzneimittel weitgehend ausgeschlossen werden. Demzufolge muß es sich hierbei also um einen niedermolekularen Hemmstoff handeln, dessen Herkunft nicht abgeklärt werden konnte.

Die Hemmstoffe aus den übrigen Proben diffundierten nicht durch die Membran, sodaß sie als Antibiotika ausgeschlossen werden können. Es ist anzunehmen, daß es sich bei ihnen um endogene oder fütterungsbedingte Hemmprinzipien gehandelt haben muß.

Außer den o.g. 4 Proben vom 6. Tag p.p. und 3 Proben vom 7. Tag p.p., von denen anzunehmen ist, daß sie Penicillin beinhalten, waren 18 weitere Viertelgemelksproben vom 6. Tag p.p. sowie 9 Viertelgemelksproben vom 7. Tag p.p. im Brillantschwarz-Reduktionstest positiv. Obwohl in den betreffenden Proben in den vorangegangenen Testverfahren (Agardiffusionstest mit *B. subtilis* und *B. stearothermophilus* var. *caldolactis* als Testkeime) keine Hemmstoffe nachgewiesen worden waren, wurden sie erneut, ein zweites und drittes Mal, im Brillantschwarz-Reduktionstest untersucht. Nur eine Probe reagierte in zwei der insgesamt drei Ansätze im Brillantschwarz-Reduktionstest positiv, während alle anderen Proben nur im ersten Ansatz ein positives Ergebnis zeigten. Zur Kontrolle wurde eine anschließende nochmalige Prüfung im Agardiffus-

ionsverfahren mit *B. stearo-thermophilus* var. *calidolactis* als Testkeim durchgeführt, bei der alle Proben, wie schon zuvor in diesem Test, hemmstoffnegativ waren. Der Grund dafür, daß im Agardiffusionsverfahren sowohl die frisch untersuchten Proben als auch die Proben nach dem Einfrieren anders reagierten, als im Brillantschwarz-Reduktionstest, könnte eventuell in einer Verklumpung von Milchbestandteilen liegen, wie sie nach dem Auftauen eingefrorener Proben beobachtet wurden. Der Überlegung, daß es dadurch zu einer Konzentrierung von Hemmstoffen kommt, die zuvor gleichmäßig in der Milch verteilt, unter der Nachweisgrenze lagen, widerspricht allerdings die Tatsache, daß die aufgetauten Proben - bis auf eine - nur beim ersten Ansatz im Brillantschwarz-Reduktionstest positiv waren und daß sie beim nachfolgenden Agardiffusionstest negativ reagierten und legt die Vermutung falsch positiver Brillantschwarz-Reduktionstest-Ergebnisse nahe, deren Ursache nicht bekannt ist. Eine Säuerung der aufgetauten Proben während ihrer 3-tägigen Lagerung im Kühlschrank wurde durch stichprobenweise pH-Messungen ausgeschlossen.

Als Nachweisgrenzen wurden für Neomycin 0,15 µg/ml (Testkeim *B. subtilis*) und für Penicillin G 0,005 µg/ml (entsprechend 0,0077 I.E./ml) mit *B. stearo-thermophilus* var. *calidolactis* im Agardiffusionsverfahren erreicht. Damit lag die Nachweisgrenze für Neomycin unter der, die vom BGA (1984) für die Verfahren zum Nachweis von Rückständen aus Tierarzneimitteln gefordert wird (0,20 µg/g). Die vom BGA (1984) angegebene Nachweisgrenze für Penicillin (0,005 I.E./g) wird allerdings nicht ganz erreicht.

Insgesamt zeigen die Rückstandsuntersuchungen, daß bei 4 von 108 trockengestellten Kühen (3,7 %) aus 12

verschiedenen Viertelgemelken (2,8 %) Hemmstoffe, die mit großer Wahrscheinlichkeit Arzneimittel waren, am 6. und/oder 7. Tag p.p. in der Milch nachgewiesen werden konnten.

Bei 3 Tieren (2,8 %), entsprechend 8 verschiedenen Viertelgemelksproben (1,9 %), handelte es sich vermutlich um Neomycin und bei einem Tier (0,9 %) auf allen 4 Eutervierteln (0,9 %) um ein β -Laktam-Antibiotikum.

Bei allen diesen Tieren lagen zwischen Verabreichung des Antibiotikums und Probennahme mehr als 40 Tage, die Wartezeit war somit abgelaufen. 4 trockengestellte Tiere, bei denen die Wartezeit nicht eingehalten wurde, wiesen in der Milch keine Hemmstoffe auf.

In einer Studie von JACOBS et al. (1972 a) wurde ebenfalls die Antibiotikaausscheidung in der Milch nach dem Trockenstellen mit einem Penicillin-Neomycin-Präparat untersucht. Die Dosierung der Antibiotika war allerdings mit 500 000 I.E. Procain-Penicillin und 300 mg Neomycin niedriger als in der vorliegenden Arbeit. Wenn die Trockenperiode länger als 5 Wochen dauerte, konnten nach dem Kalben keine Antibiotikarückstände nachgewiesen werden.

DE MARIA et al. (1980) untersuchten die Persistenz von Antibiotikarückständen in der Milch nach Trockenstellen mit einem Präparat auf Penicillin-Streptomycin-Basis, wobei die Menge der langwirkenden Penicillin-Komponente (1 000 000 I.E. Procain-Penicillin-G) derjenigen von Mastitar^Rforte entspricht. Nach 72 Stunden p.p. waren in keinem der Viertelgemelke Antibiotika nachweisbar.

Auch von OLIVER et al. (1984) konnten in keiner Kolostrumprobe nach dem Trockenstellen mit einem Penicillin-

Streptomycin-Präparat (1 000 000 I.E. Procain-Penicillin) im Delvotest-P-Verfahren Hemmstoffe nachgewiesen werden.

Ebensowenig konnten HILL und SMALL (1985) bei ihren Untersuchungen mit einem Penicillin-Streptomycin-Präparat (1 000 mg Procain-Penicillin, 500 mg Dihydrostreptomycin) am 6. Tag nach dem Kalben Antibiotika-Rückstände in der Milch nachweisen.

Im Gegensatz dazu steht der Bericht über eine mit Mastitar^R forte trockengestellte Kuh, bei der nach über 3 Monaten Laktationspause bis zum 12. Tag p.p. in der Anfangssammelgemelksprobe aus allen 4 Eutervierteln im Brillantschwarz-Reduktionstest Hemmstoffe nachgewiesen wurden (RUSS, 1987).

Neben der Ausscheidungsdauer wurde auch die Wirksamkeit des Trockenstellers geprüft. Anhand von zytologischen und bakteriologischen Untersuchungen vor dem Trockenstellen wurde der Gesundheitszustand des Euters überprüft. Dabei betrug der Anteil der Tiere, bei denen der California-Mastitis-Test (CMT) auf mindestens einem Euterviertel positiv ausfiel, 34,3 %.

Verglichen mit den Ergebnissen von FEUERSTEIN (1987) mit 66,9 % und NEUMANN-PAULITSCHKE (1987) mit 50,4 % war der Prozentsatz relativ niedrig.

Im Kieler Ausstrichverfahren wiesen 84,5 % der CMT-positiven Proben einen erhöhten Zellgehalt auf. Die unterschiedlichen Befunde lassen sich wohl damit erklären, daß beim CMT offensichtlich auch falsch-positive Reaktionen auftreten können (OBIGER, 1961, 1962). Im Kieler Ausstrichverfahren konnten bei 16,7 % (das entspricht 14 Viertelgemelksproben) mit erhöhtem Zellgehalt auch Keime registriert werden. Die

in diesen Ausstrichen vermehrt vorliegenden Granulozyten deuten auf einen entzündlichen Vorgang hin.

Bei 32 Viertelgemelken (45,1 %), die im Kieler Ausstrichverfahren einen erhöhten Zellgehalt aufwiesen, wurden kulturell vermehrt (>250 Keime/ml Milch) euterpathogene oder potentiell pathogene Mikroorganismen isoliert. Bei den Erregern handelte es sich vorwiegend um "sonstige Streptokokken" (43,8 %) und "sonstige Micrococcaceae" (34,4 %).

Bei 35 Proben (9,7 %), die entsprechend dem Kieler Ausstrichverfahren bzw. dem CMT einen normalen Zellgehalt aufwiesen, wurden ebenfalls euterpathogene Keime nachgewiesen. Auch hier handelte es sich vor allem um "sonstige Streptokokken" (45,7 %) und um "sonstige Micrococcaceae" (40,0 %). Bei diesen Fällen ist anzunehmen, daß hier latente Infektionen vorlagen.

Der Vergleich der kulturellen Ergebnisse vor und nach dem Trockentstellen ergab, daß nur bei einer Kuh auf einem Euterviertel sowohl vor dem Trockenstellen als auch am 6. Tag p.p. euterpathogene Mikroorganismen nachgewiesen wurden (*S. aureus*). Die anderen 66 Viertelgemelke, die vor dem Trockenstellen einen positiven bakteriologischen Befund aufwiesen, waren am 6. Tag p.p. kulturell negativ. Dies entspricht einer Heilungsrate von 98,5 %. Im Vergleich mit den Ergebnissen von FEUERSTEIN (1987) mit 85,4 % und NEUMANN-PAULITSCHKE (1987) mit 76,9 % lag der Anteil relativ hoch.

Am 6. Tag nach dem Kalben wurden in 19 Viertelgemelkproben von 12 Kühen, die vor dem Trockenstellen kulturell negativ waren, vermehrte euterpathogene Keime nachgewiesen. Dabei dominierten "sonstige Micrococcaceae" (12 Viertelgemelke) und "sonstige Streptokokken" (5 Viertelgemelke).

Außerdem entstanden bei 3 Tieren während der Trockenperiode bzw. nach dem Abkalben klinische Mastitiden, als deren Ursachen Streptokokken ermittelt wurden. Das entspricht einer Neuinfektionsrate von 4,4 bzw. einschließlich der klinisch euterkranken Kühe 5,0 %, bezogen auf die Euterviertel.

Da in die Untersuchungen keine unbehandelten Tiere als Vergleichsgruppe mit einbezogen wurden, kann über die eventuelle Selbstheilungsrate infizierter Euterviertel keine Angaben gemacht werden. Ein Vergleich mit den in der Literatur angegebenen Ausheilungs- und Neuinfektionsrate an unbehandelten Tieren (NEAVE et al., 1950; SMITH et al., 1967 a, b; PEARSON und WRIGHT, 1969; ROSENZUAIG und MAYER, 1970) zeigt jedoch eine deutliche Wirksamkeit des Trockenstellers.

Dies bestätigt auch eine Studie von VIGUE (1954) mit einer Trockenstellpräparation, die 200 000 I.E. Penicillin-G-Na und 200 mg Neomycin enthielt, in der alle vorhandenen (19) Euterinfektionen ausgeheilt wurden.

PEARSON und WRIGHT (1969) untersuchten die Wirksamkeit eines Penicillin-Präparates (300 mg Procain-Penicillin-G): 92 % der Streptokokken- und 38 % der Staphylokokken-Infektionen wurden ausgeheilt, während in der Vergleichsgruppe ohne antibiotische Behandlung beim Trockenstellen die Ausheilungsraten bei nur 65 bzw. 16 % lagen. Die Neuinfektionsrate bei den behandelten Kühen lag bei 14 %, in der Kontrollgruppe bei 16 %.

WARD und SCHULZ (1973), die Kühe nur mit Neomycin (500 mg Neomycinsulfat in öliger Suspension) trockenstellten, erreichten bei infizierten Eutervierteln (*S. agalactiae*, *S. uberis*, *S. aureus*, gramnegative

Stämme) eine Heilungsrate von 39 %.

Bei in-vitro-Versuchen von JACOBS et al. (1972 c) mit 266 aus Mastitismilch isolierten Streptokokken und Staphylokokken war ein Penicillin-Neomycin-Kombinationspräparat (500 000 I.E. Procain-Penicillin und 300 mg Neomycin) gegen alle isolierten Erreger wirksam.

Die Ergebnisse der genannten Autoren deuten darauf hin, daß die Antibiotika-Kombination von Penicillin und Neomycin eine bessere Wirksamkeit zeigt, als dies bei Verwendung nur einer Komponente der Fall ist.

5 Zusammenfassung

An 108 mit einem Penicillin-Neomycin-Präparat trockengestellten Kühen wurde geprüft, ob nach Ablauf der gesetzlich vorgeschriebenen Wartezeit noch Antibiotikarückstände in der Milch vorhanden waren. Zu diesem Zweck wurden Viertelgemelke im Agardiffusionstest mit *B. subtilis* bzw. *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* als Testkeim (Blättchentest) sowie im Brillant-schwarz-Reduktionstest (BRT) (Testkeim: *B. stearothermophilus* var. *calidolactis*) untersucht.

Vor dem Trockenstellen wurden in einer Viertelgemelksprobe (0,3 %) hitzestabile Hemmstoffe gefunden. Im Agardiffusionsverfahren mit *B. subtilis* wurden am 6. Tag post partum (p.p.) in 7 (1,6 %) und am 7. Tag p.p. in 2 (0,5 %) Viertelgemelksproben Hemmstoffe nachgewiesen, bei denen es sich wahrscheinlich um Neomycin handelte. Außerdem wurden bei einer Kuh in 4 Viertelgemelken (0,9 %) am 6. und 7. Tag p.p. mit *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* Hemmstoffe gefunden, von denen anzunehmen ist, daß es sich um Penicillin handelte. Die sehr vereinzelt nachgewiesenen Rückstände dürften auf Abweichungen im Ausscheidungsverhalten der einzelnen Kühe und nicht auf Eigenschaften des Präparates beruhen.

Zur Wirksamkeitsüberprüfung des verwendeten Präparates wurden die Ergebnisse der zytologischen und kulturell-bakteriologischen Untersuchungen vor dem Trockenstellen mit den kulturell-bakteriologischen Ergebnissen am 6. Tag nach dem Kalben verglichen. Vor dem Trockenstellen waren in 66 Viertelgemelken vermehrt euterpathogene Mikroorganismen nachzuweisen, von denen lediglich auf einem Euterviertel Staphylokokken auch nach dem Abkalben nachweisbar waren. Dies entspricht einer Heilungsrate von 98,5 %. Allerdings wurden in 19 vor dem Trockenstellen kulturell negativen Viertelgemelken nach dem Kalben vermehrt euterpathogene Keime nachgewiesen. Bei den positiven bakteriologischen Befunden vor dem Trockenstellen dominierten "sonstige Streptokokken", nach dem Kalben waren "sonstige Micrococcaceae" am häufigsten nachweisbar.

5 Summary

Investigations on elimination and effectiveness after drying off cows with a penicillin-neomycin-preparation

108 cows dried off with a penicillin-neomycin-preparation were examined on antibiotic residues in milk after the expiration of the withholding time. For this purpose quarter-milk samples were tested by the agar diffusion-method (disc assay) with *B. subtilis* and *B. stearothermophilus* var. *calidolactis*, respectively, as test organism as well as the brilliantblack reduction-test (BRT) (BRT; test organism: *B. stearothermophilus* var. *calidolactis*).

Before the treatment one sample (0,3 %) contained thermostable inhibitors. 7 quarters (1,6 %) from the 6th day and 2 quarters (0,5 %) from the 7th day after parturation contained inhibitory substances, probably neomycin, detected by the agar diffusion-method with *B. subtilis*. All samples (0,9 %) of one cow from the 6th and 7th day p.p. examined with *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* were also positive. This inhibitory substance was probably penicillin. The residues detected in very few cases may be contributed to abnormal secretion behaviour and not to properties of the preparation.

In order to investigate the efficacy of the applied preparation the results of the cytological and cultural bacteriological examination before drying off were compared with those obtained on the 6th day after parturation. Before drying off, increased numbers of pathogenic microorganisms were found in 66 quarters. Of these only one infected quarter (*S. aureus*) excreted these bacteria after parturation, too. This implies a curing rate of 98,5 %. 19 quarters with negative bacteriological results before drying off was "other streptococci" and "other micrococcaceae" after parturation, respectively.

6 Literaturverzeichnis

AIKAWA, K. und G. CHIKUMA (1979):

Studies on the analysis of chloramphenicol in
livestock products.

Bull. Nat. Inst. Anim. Ind. 36, 135-144

AOAC METHODS (1980):

42. Drugs in feeds, p. 695

in: HORWITZ, W.

Official methods of analysis of the Association
of Official Analytical Chemists.

AOAC, Washington

ALAWI, M.A. und H.A. RUSSEL (1981):

Determination of sulphonamides in milk by HPLC
with electrochemical detection.

Fresenius Z. Anal. Chem. 307, 382-384

ARNOLD, D., D. VOM BERG, A.K. BOERTZ, U. MALLICK und
A. SOMOGYI (1984):

Radioimmunologische Bestimmung von Chlorampheni-
col-Rückständen in Muskulatur, Milch und Eiern.

Arch. Lebensmittelhyg. 35, 131-136

ARNOLD, D. und A. SOMOGYI (1985):

Trace analysis of chloramphenicol residues in eggs,
milk and meat: comparison of gas chromatography
and radioimmunoassay.

JAOAC 68, 984-990

ARRET, B., D.P. JOHNSON und A. KIRSHBAUM (1971):

Outline of details for microbiological assay of
antibiotics: second revision.

J. Pharm. Sci. 60, 1689-1694

BARBIERS, A.R. und A.W. NEFF (1967):

Development of an assay for neomycin in feeds.

JAOAC 50, 462-467

BECHEIRAZ, M., A. HALDEMANN und R. ETTER (1983):

Bestimmung von Chloramphenicol in tierischen Lebensmitteln.

Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 74, 147-155

BERGNER-LANG, B. und M. KÄCHELE (1985):

Schnellmethode zur gaschromatographischen Bestimmung von Chloramphenicol in Milch.

Dtsch. Lebensm. Rdsch. 81, 278-280

BILLON, J. und S.H. TAO (1979):

Détection des antibiotiques dans le lait.

Lait 59, 361-375

BODE, H., H. WIELINGER und L. WIECZOREK (1983):

Antibakterielle Stoffe im Urin.

Z. Allg. Med. 59, 781-783

BOERTZ, A.K. (1984):

Diss. Fachbereich 13, Berlin

zit. nach BERGNER-LANG, B. und M. KÄCHELE (1985)

BOSSUYT, R., R. VAN RENTERGHEM und G. WAES (1976):

Identification of antibiotic residues in milk by thin-layer chromatography.

J. Chromatogr. 124, 37-42

BROWN, R.J., M. WILCHEK und H.E. SWAISGOOD (1980):

Detection and measurement of antibiotics in biological fluids by enzyme immunoassay

J. Dairy Sci. 63, 54-55

BROWN, R.J. (1981):

A sensitive fast on farm test for antibiotics
in milk.

Nat. Mastitis Counc. 20, 110-115

BUFF, B. (1986):

pers. Mitteilung

zit. nach FEUERSTEIN, A. (1987)

BUNDESGESUNDHEITSAMT (BGA) (1980):

Nachweis von Hemmstoffen in der Milch (Referenz -
verfahren).

Amtl. Sammlung von Untersuchungsverfahren nach

§ 35 LMBG, Band I/1, L 01.00-6

Beuth-Verlag, Berlin-Köln

BUNDESGESUNDHEITSAMT (BGA) (1980):

Nachweis von Hemmstoffen in der Milch (Brillant-
schwarz-Reduktionstest).

Amtl. Sammlung von Untersuchungsverfahren nach

§ 35 LMBG, Band I/1, L 01.00-11

Beuth-Verlag, Berlin-Köln

BUNDESGESUNDHEITSAMT (BGA) (1980):

Nachweis von Hemmstoffen in der Milch (Routine-
verfahren).

Amtl. Sammlung von Untersuchungsverfahren nach

§ 35 LMBG, Band I/1, L 01.00-18

Beuth-Verlag, Berlin-Köln

BUNDESGESUNDHEITSAMT (BGA) (1984):

Erste Bekanntmachung über Nachweisgrenzen und
Fristen zum Einreichen von Unterlagen über Rück-
standsnachweisverfahren und Kontrollmethoden für
Tierarzneimittel

Bundesanzeiger Nr. 242 v. 28. 12. 1984, S. 14137-
14138

CHARM, S.E. (1979):

A 15 minute assay for penicillin and other antibiotics.

Cult. Dairy Prod. J. 14, 24-26

CHARM, S.E. und R.K. CHI (1982):

Rapid screening assay for β -lactam-antibiotics in milk: collaborative study.

JAOAC 65, 1186-1192

CHRISTIE, R., N.E. ATKINS und E. MUNCH-PETERSEN (1944):

A note on a lytic phenomenon shown by group B streptococci.

Austr. J. exp. Biol. med. Sci. 22, 197-200

COGAN, T.M. und G.F. FITZGERALD (1980):

A rapid method for the detection of penicillin in milk.

Ir. J. Fd. Sci. Technol. 4, 79-88

CORRY, J.E.L., M.R. SHARMA und M.L. BATES (1983):

Detection of antibiotic residues in milk and animal tissues.

Techn. Ser., Society for Applied Bact. 18, 349-370

COX, P.L. und J.P. HEOTIS (1962):

Determination of furaltadone and nitrofurazone in milk.

J. Agr. Food Chem., 10, 402-403

DIESELBEN (1963):

Determination of furaltadone in milk.

J. Agr. Food Chem. 11, 499-501

DANNEMANN, R. (1973):

Versuche zur Verbesserung der Eutergesundheit
durch Trockenstellen von Milchkühen mit Benzathin-
Oxacillin (Stapenor^R Retard, Bayer) und Benzathin-
Cloxacillin (Gelstaph^R Retard, Beecham).
Diss. med. vet., Berlin

DE MARIA, C.G., S. PUPPO und A. ALOISI (1980):

Persistence of antibiotics in milk from cows
treated in dry period-effect of the treatment
on the milk quality after calving.
Ann. Ist. Sper. Zootec. 13, 63-77

DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG (DIN) (1981):

Nachweis von Hemmstoffen in der Milch (Referenz-
verfahren).
DIN 10 182, Teil 1
Beuth-Verlag, Berlin-Köln

DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG (DIN) (1982):

Nachweis von Hemmstoffen in der Milch (Brillant-
schwarz-Reduktionstest).
DIN 10 182, Teil 2
Beuth-Verlag, Berlin-Köln

DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG (DIN) (1983):

Nachweis von Hemmstoffen in der Milch (Routine-
verfahren).
DIN 10 182, Teil 3
Beuth-Verlag, Berlin-Köln

DEUTSCHE VETERINÄRMEDIZINISCHE GESELLSCHAFT (DVG)
(1980):

Die subklinische Mastitis des Rindes. Vorschlä-
ge für bundeseinheitliche Richtlinien zu ihrer
Bekämpfung.

Fachgruppe Milchhygiene des Arbeitsgebietes Le-
bensmittelhygiene der DVG, Kiel

EBERHART, R.J. und J.M. BUCKALEW (1972):

Evaluation of a hygiene and dry period therapy
program for mastitis control.

J. Dairy Sci. 55, 1683-1691

FEUERSTEIN, A. (1987):

Untersuchungen zur Ausscheidungsdauer und Wirk-
samkeit nach dem Trockenstellen mit einem Oxa-
cillinpräparat.

Diss. med. vet., München

FRANK, H. (1965):

Nachweis von Hemmstoffen in Milch und Milchpulver.
Milchwiss. 20, 361-365

FRERE, J.-M., D. KLEIN und J.-M. GHUYSEN (1980):

Enzymatic method for rapid and sensitive determi-
nation of β -lactam-antibiotics.

Antimicrob. Ag. Chemother. 18, 506-510

GALESLOOT, T.E. und F. HASSING (1962):

A rapid and sensitive paper disc method for the
detection of penicillin in milk.

Neth. Milk Dairy J. 16, 93-94

GREGERSEN, T. (1978):

Rapid method for the distinction of gramnegative from grampositive bacteria.

Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 5, 123-127

GROVE, D.C. und W.A. RANDALL (1955):

zit. nach CORRY, J.E.L., M.R. SHARMA und M.L. BATES (1983)

HAMANN, J., A. TOLLE, A. BLÜTHGEN und W. HEESCHEN (1975 a):

Untersuchungen über Nachweis, Isolierung und Identifizierung von Antibiotikarückständen in der Milch, 1. Mitteilung: Isoxazolympenicilline, Milchwiss. 30, 1-7

DIESELBEN (1975 b):

Untersuchungen über Nachweis, Isolierung und Identifizierung von Antibiotikarückständen in der Milch, 2. Mitteilung: Chloramphenicol. Milchwiss. 30, 68-75

HAMANN, J., W. HEESCHEN, A. TOLLE und G. HAHN (1975 c):

Untersuchungen über Nachweis, Isolierung und Identifizierung von Antibiotikarückständen in der Milch, 3. Mitteilung: Nachweis von Hemmstoffen mit Hilfe der enzymatisch-fluorometrischen Milchsäurebestimmung in der kontinuierlichen Durchflußanalyse
Milchwiss. 30, 139-143

HAMANN, J., W. HEESCHEN und A. TOLLE (1979 a):

Untersuchungen über Nachweis, Isolierung und Identifizierung von Antibiotikarückständen in der Milch, 4. Mitteilung: Tetracycline.
Milchwiss. 34, 357-359

DIESELBEN (1979 b):

Untersuchungen über Nachweis, Isolierung und Identifizierung von Antibiotikarückständen in der Milch. 3. Mitteilung: Streptomycine.
Milchwiss. 34, 479-480

DIESELBEN (1980):

Untersuchungen über Nachweis, Isolierung und Identifizierung von Antibiotikarückständen in der Milch, 6. Mitteilung: Die Hemmung der Laktatbildung als Meßkriterium im Screening-Test.
Milchwiss. 35, 544-546

HAMANN, J. (1983):

Untersuchungen über den Nachweis von Tetracyclinen in Milch und Blut.
Milchwiss. 38, 73-75

HAVERBECK, J., W.M.A. MULLAN und A.L. WALKER (1983):

Sensitivity of the intertest, oxoid test, delvotest P and disc assay to antibiotics.
J. Soc. Dairy Techn. 36, 36-40

HEESCHEN W. und G. SUHREN (1986):

Zur Stellung eines mikrobiellen Rezeptortests (Charm-Test II) in einem System zum Nachweis und zur Identifizierung antibiotisch wirksamer Hemmsubstanzen in Milch.
Milchwiss. 41, 749-753

HILL, B.M. und J.M. SMALL (1985):

Antibiotic residue release at the beginning of lactation following dry cow therapy.

N. Z. Vet. J. 33, 105-107

HOLLSTEIN, E., W. LAUE und G. ZAPF (1981):

Gaschromatographische Bestimmung von Chloramphenicol-Rückständen in tierischem Material,

Nahrung 25, 143-149

HOLTMANNSPÖTTER, H. und H.P. THIER (1982):

Analysenmethode für Rückstände von 6 Sulfonamiden und Chloramphenicol durch Gaschromatographie an Glaskapillaren.

Dtsch. Lebensm. Rdsch. 78, 347-350

IGARASHI, R.T., R.W. BAUGHMAN, F.E. NELSON und P.A. HARTMAN (1960):

Rapid antibiotic assay methods using Bac. steartophilus.

J. Dairy Sci. 43, 841-842

DIESELBEN (1961):

Rapid antibiotic assay methods using Bac. steartophilus.

J. Milk Food Techn. 24, 143-146

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (IDF) (1986):

Detection of inhibitors.

E-Doc 244

JACOBS, J., M. KLASSENS und A. PENNINGES (1972 a):

An investigation into the characteristics of two
"dry-cow products".

Tijdschr. Diergeneesk. 97, 466-476

DIESELBEN (1972 b):

A simple rapid test for the detection of antibiotic
residues in milk.

Tijdschr. Diergeneesk. 97, 548-550

DIESELBEN (1972 c):

An investigation about the antibiotic sensitivity
of mastitis strains frequently isolated in the
Netherlands.

Tijdschr. Diergeneesk. 97, 586-592

JAKSCH, P. (1986):

Zur Eignung eines Schnelltests (Spot-Test) für
den Nachweis von Antibiotika der Beta-Laktam-
Gruppe in Rohmilch.

27. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes "Lebensmit-
telhygiene" der DVG, 9.-12.9.1986 in Garmisch-
Partenkirchen

JOHNSON, M.E., J.H. MARTIN, R.J. BAKER und J.G. PAR-
SONS (1977):

Persistence of antibiotics in milk from cows treated
late in the dry period.

J. Dairy Sci. 60, 1655-1661

KALTWASSER G., D. BANAUCH und L. WIECZOREK (1983):

Nachweis antibakterieller Substanzen im Harn mit
Teststreifen.

Münch. Med. Wschr. 125, 694-696

KARKOCHA, J. (1981):

Detection of tylosine residues in milk.

Roczn. Panstw. Zakl. Hig. 32, 319-321

KARLOWSKI, K. (1976):

Detection of chloramphenicol residues in milk by the method of gas chromatography.

Roczn. Panstw. Zakl. Hig. 27, 629-633

KATZ, S.E. und C.A. FASSBENDER (1970):

Sensitive microbial assay procedure for chlortetracycline in milk and related products.

JAOAC 53, 968-972

KINGWILL, R.G., F.K. NEAVE, F.H. DODD, T.K. GRIFFIN

und D.R. WESTGARTH (1970):

The effect of a mastitis controlsystem on levels of subclinical and clinical mastitis in two years.

Vet. Rec. 82, 94-100

KITAGAWA, T., T. KANAMARU, H. WAKAMATSU, H. KATO, S. YANO, und Y. ASANUMA (1978):

A new method for preparation of an antiserum and its application for novel enzyme immunoassay of penicillin.

J. Biochem. 84, 491-494

KRAACK J. und A. TOLLE (1967):

Brillantschwarz-Reduktionstest mit Bac. stearothermophilus var. calidolactis zum Nachweis von Hemmstoffen in der Milch.

Milchwiss. 22, 669-673

DIESELBEN (1969):

Zum Nachweis von Hemmstoffen in Milch mit dem Brillantschwarz-Reduktionstest.

1. Teil: Verbesserte Methode

Arch. Lebensmittelhyg. 20, 145-149

LALOUX, J., J. DEGELAEN und P. COLART (1982):

Procédé enzymatique pour la détection rapide d'
antibiotiques à noyau bêta-lactame dans le lait.
Lait 62, 720-728

LEVINE, B.B. (1960):

Degradation of benzylpenicilline at pH 7,5 to
D-benzylpenicilloic acid.
Nature 187, 939-940

LIMMER, H.D. (1969):

Hemmstoffe in der Milch.
Arch. Lebensmittelhyg. 20, 227-231

LOTT, A.F., R. SMITHER und D.R. VAUGHN (1985):

Antibiotic identification by high voltage electro-
phoresis bioautographie.
JAOAC 68, 1018-1020

MACAULY, D.M. und V.S. PACKARD (1981):

Evaluation of methods used to detect antibiotics
in milk.
J. Food Prot. 44, 696-698

MÄRTLBAUER, E. und G. TERPLAN (1987):

Ein enzymimmunologischer Nachweis von Chlorampheni-
col in Milch.
Arch. Lebensmittelhyg. 38, 3-7

MALISCH, R., U. SANDMEYER und K. KYPKE-HUTTER (1984):

Zur Bestimmung von Sulfonamiden, Nitrofuranen, Chlor-
amphenicol und Trimethoprim in Lebensmitteln tieri-
schen Ursprungs.
Lebensmittelchem. Gerichtl. Chem. 38, 11-12

MESSER, J.W., L.L. CLAYPOOL, G.A. HOUGHTBY, E.M. MIKOLJCIK und E.L. SING (1978):

Detection of antibiotic residues in milk and dairy products.

in: Standard methods for the examination of dairy products

zit. nach CORRY et al. (1983)

METHODENKOMMISSION (DEUTSCHE KOMMISSION ZUR VEREINHEITLICHUNG DER UNTERSUCHUNGSMETHODEN FÜR MILCH, MILCHPRODUKTE UND MOLKEREIHILFSSTOFFE) (1960):

Die mikrobiologischen Methoden für die Untersuchung von Milch und Milcherzeugnissen.

Milchwiss. 15, 120-129

MICHALSKI, M., B. WOJTON und A. LOFFET (1984):

Evaluation of the usefulness of the penzym test for the detection of penicillin in milk.

Bull. vet. Inst. Pulawy 27, 115-118

MIURA, T., H. KOUNO und T. KITAGAWA (1981):

Detection of residual penicillin in milk by sensitive enzyme immunoassay.

J. Pharm. Dyn. 4, 706-710

MOATS, W.A. (1983):

Detection of penicillin G, penicillin V and cloxacillin in milk by reversed-phase high performance liquid chromatography.

J. Agric. Food Chem. 31, 880-883

MOL, H., S. BRANDSMA und E.C. BAKKER-DE KOOF (1970):

Invloed van de duur der droogstandperiode op het voorkomen van antibioticaresiduen in de melk na behandeling mit penicilline houdende preparaten met een lange werkingsduur aan het begin der droogstandperiode.

Tijdschr. Diergeneesk. 95, 785-791

MUNNS, R.K., W. SHIMODA, J.E. ROYBAL und C. VIEIRA (1985):

Multi residue method for detection of 8 neutral β -lactam-penicillins in milk by fluorescence-liquid chromatography.

JAOAC 68, 968-971

NATZKE, R.P., R.W. EVERETT und D.R. BRAY (1974):

Effect of drying off practices on mastitis infection.
J. Dairy Sci. 58, 1328-1335

NEAVE, F.K., F.H. DODD und E. HENRIQUES (1950):

Udder infections in the dry period.

J. Dairy Res. 17, 37-49

NEUMANN-PAULITSCHKE, C. (1987):

Untersuchungen zu Ausscheidungsduer und Wirksamkeit nach dem Trockenstellen von Kühen mit einem Cloxacillin-Präparat.

Diss. med. vet., München

OBIGER, G. (1961):

Reichweite und Bedeutung der sogenannten Schnellmethode sowie weiterer Laboratoriumsuntersuchungen zur Feststellung von Euterentzündungen

Kieler Milchw. Forschungsber. 13, 293-304

DERSELBE (1962):

Mastitisdiagnose.

Kieler Milchw. Forschungsber. 14, 307-325

OLIVER, S.P., R.T. DUBY, R.W. PRANGE und J.P. TRITSCHLER
(1984):

Residues in colostrum following antibiotic dry cow
therapy.

J. Dairy Sci. 67, 172-173

VAN OS, J.L., S.A. LAMERIS, J. DOODEWARD und J.G. OOST-
TENDORP (1975):

Diffusion test for the determination of antibiotic
residues in milk.

Neth. Milk Dairy J. 29, 16-34

PAAR, G.E. (1962):

Determination of nitrofurazone in milk.

J. Agric. Food Chem. 10, 291-292

PEARSON, J.K.L. und C.L. WRIGHT (1969):

Dry cow therapy as a means of controll in bovine mas-
titis.

Vet. Rec. 83, 294-298

PETZ, M. (1982):

Verfahren zur rückstandsanalytischen Bestimmung von
Furazolidon und 4 weiteren Nitrofuranen in Eiern,
Milch und Fleisch durch HPLC.

Dtsch. Lebensm. Rdsch. 78, 396-401

DERSELBE (1983 a):

Hochdruckflüssigchromatographische Rückstandsanalyse von Chloramphenicol, Furazolidon und 5 Sulfonamiden in Eiern, Fleisch und Milch.

Z. Lebensm. Unters. Forsch. 176, 289-293

DERSELBE (1983 b):

Rückstandsanalyse von Chloramphenicol und verschiedenen Sulfonamiden in Eiern, Milch und Fleisch durch HPLC.

Lebensmittelchem. Gerichtl. Chem. 37, 43

ROHNER, P., M. SCHÄLLIBAUM und J.NICOLET (1985):

Detection of penicillin G and its Benzylpenicilloyl (BPO)-derivates in cow milk and serum by means of an ELISA.

J.Food Prot. 48, 59-62

ROSENZUAIG, A. und E. MAYER (1970):

A note on dry cow therapy in an israeli dairy herd.
Vet. Rec. 87, 409-410

RUIG, W.G. und H. HOOIJERINK (1985):

Determination of chloramphenicol in milk by HPLC with electrochemical detection.

Neth. Milk Dairy J. 39, 155-163

RUSS, .. (1987):

Pers. Mitteilung

RYAN, J.J. und J.A. DUPONT (1974):

Chemical analysis of tetracycline residues in animal tissues.

JAOAC 57, 828-831

RYAN, J.J., C.L. YOUNG, J.A. DUPONT und C.F. CHAR-BONNEAU (1975):

A screening method for determination of nitrofurantol dry residues in animal tissues.

JAOAC 58, 1227-1231

RYAN, J.J. (1983):

Antibiotic tests screen raw milk.

Dairy Field 166, 48-49

SABATH, L.D. (1972):

4.11. Rapid assay of some nephrotoxic antibiotics in mixtures.

in: KAVANAGH, F.:

Analytical Microbiology II, p. 235-248

Academic Press, New York and London

SCHWARTZ, D.P. und F.E. MC DONOUGH (1984):

Practical screening procedure for chloramphenicol in milk at low parts per billion level.

JAOAC 67, 563-565

SEELEMAN, M. und G. OBIGER (1956):

Technik und Methode der Milchuntersuchung zwecks Feststellung von Sekretionsstörungen bzw. Euter-erkrankungen.

Molkerei-Ztg. 42, 2809-2812, 2825-2827

SMITH, A., F.K. NEAVE und F.H. DODD (1966):

Methods of reducing the incidence of udder infection in dry cows.

Vet. Rec. 79, 233-236

SMITH, A., F.K. NEAVE und A. JONES (1967 a):

The persistence of penicillin G in the mammary gland when infused immediately after the last milking of lactation.

J. Dairy Res. 34, 59-64

SMITH, A., D.R. WESTGARTH, M.R. JONES, F.K. NEAVE und F.H. DODD (1967 b):

Methods of reducing the incidence of udder infection in dry cows.

Vet. Rec. 80, 504-510

SØGARD, H., R. HUUSOM und M.-L. SCHMIDT-NIELSEN (1980):

Påvisning af streptomycin og andre aminoglycosider i mælk.

Dansk Vet. Tidsskr. 63, 761-767

STADHOUDERS, J., F. HASSING und T.E. GALESLOOT (1981):

An electrophoretic method for the identification of antibiotic residues in small volumes of milk.

Neth. Milk Dairy J. 35, 23-33

STONE, L.R. (1964):

Determination of trace amounts of nitrofurazone in milk.

J. Agric. Food Chem. 12, 121-123

SUHREN, G. und W. HEESCHEN (1987 a):

Detection of antibiotics in milk with a modified microbial receptor assay (Charm test II).

Milchwiss. 42, 493-496

DIESELBEN (1987 b):

Zum Nachweis von Antibiotika und Hemmstoffen in Milch und Milchprodukten.

28. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes "Lebensmittelhygiene der DVG, 29.9.-2.10. 1987 in Garmisch-Partenkirchen

TERADA, H. und Y. SAKABE (1985):

Studies on residual antibacterials in foods
IV. Simultaneous determination of penicillin G,
penicillin V and ampicillin in milk by high-perfor-
mance liquid chromatography.
J. Chromatogr. 348, 379-387

TERPLAN, G., K.-J. ZAADHOF, H. ANGERSBACH und M. SKAR-
LAKIDOU (1973):

Zur Abgrenzung unspezifischer Hemmungen von B.
stearothermophilus var. calidolactis beim Nachweis
von Hemmstoffen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs
Ursprungs (vorläufige Mitteilung).
Arch. Lebensmittelhyg. 30, 197-236

TERPLAN, G., K.-J. ZAADHOF und H. ANGERSBACH (1979):

Vorkommen und Bedeutung von Antibiotika-Rückständen
in Lebensmitteln.
Arch. Lebensmittelhyg. 30, 197-236

TERPLAN, G. (1984):

pers. Mitteilung

THOROGOOD, S.A. und G.A. PRETICE (1982):

Evaluation of the charm-test - a rapid method for
the detection of penicillin in milk.
21. International Dairy Congress, Moscow
Vol. 1, Book 2, p. 418-419

THOROGOOD, S.A., P.D.P. WOOD und G.A. PRENTICE (1983):

An evaluation of the charm-test - a rapid method
for the detection of penicillin in milk.
J. Dairy Res. 50, 185-191

TOLLE, A. (1983):

Hygiene der Milch.
in: GRAVERT, W.O.:
Die Milch, p. 211-305
Ulmer-Verlag, Stuttgart

TRALDI, P., S. DAOLIO und B. PELLI (1985):

Rapid, sensitive and specific determination of oxy-
tetracycline residues in bovine milk and meat by
cad mikes analysis at the 1 ppb level.
Biomed. Mass Spectr. 12, 493-496

TSUJI, A., E. MIYAMOTO und T. YAMANA (1978):

A new fluorometric method for simultaneous determi-
nation of penicillin and penicilloic acids.
J. Pharm. 30, 811-813

VIGUE, F. (1954):

Relative efficacy of 3 antibiotic combinations in
bovine mastitis.
J.A.V.M.A. 124, 377-378

VILIM, A., S.D. MOORE und L. LAROQUE (1979):

Microbiological determination of penicillin G, ampicil-
lin and cloxacillin residues in milk.
JAOAC 62, 1247-1250

WAL, J.M., J.C. PELERAN und G.F. BORIES (1979):

Electron-capture detection of chloramphenicol using
a heptafluorobutyrate derivate
J. Chromatogr. 168, 179-185

DIESELBEN (1980):

High-performance liquid chromatographic determination
of chloramphenicol in milk.
JAOAC 63, 1044-1048

WAL, J.M., und G.F. BORIES (1981):

In vitro penicillin aminolysis: application to a radio immuno assay of trace amounts of penicillin.
Anal. Biochem. 114, 263-267

WALSER, K. (1984):

Nachweis von antibakteriellen Substanzen in der Milch mit einem Streifentest.
Tierärztl. Umsch. 39, 790-794

WARD, G.E. und L.H. SCHULTZ (1973):

Incidence and control of mastitis during dry period.
J. Dairy Sci. 57, 1341-1349

WESTHOFF, D.C. und T. ENGLER (1975):

Detection of penicillin in milk by bioluminescence.
J. Milk Food Techn. 38, 537-539

WILLIAMS, G.R. (1984):

Use of bioluminescence in the determination of the antibiotic content of milk.
J. Soc. Dairy Techn. 37, 40-41

WRIGHT, R.C. und J. TRAMER (1961):

The estimation of penicillin in milk.
J. Soc. Dairy Techn. 14, 85-87

WYATT, P.J., D.T. PHILLIPS und E.H. ALLEN (1976):

Laser light scattering bioassay.
J. Agric. Food Chem. 24, 984-988

ZIV, G., A. SARAN-ROSENZUAIG und E. GLUCKMANN (1973):

Retention of antibiotics in dry-udder secretion after the infusion of several "dry cow" antibiotic products.
Zbl. Vet. Med. 20, 415-424

ANONYM (1979):

Die Zeit der Produktionsverluste durch Penicillin
in der Rohmilch ist vorbei.

Dtsch. Milchw. 6, 192

ANONYM (1979):

Schnellnachweis von Penicillin in Milch in 9 Minuten.

Dtsch. Molk. Ztg. 26, 962

Abschließend möchte ich Herrn Prof. Dr. G. Terplan für die Überlassung des Themas danken.

Der Firma Vemie danke ich für die kostenlose Überlassung des Trockenstellpräparates.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. R. Schön für die Betreuung bei der Fertigstellung der Arbeit.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern des Institutes, die zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben, insbesondere Frau H. Schäffer für ihre stets gewährte Hilfsbereitschaft bei der Durchführung des Versuchs.

Lebenslauf

Am 13. Juni 1961 wurde ich als Tochter des Tierarztes Dr. Elmar Schwing und seiner Frau Hedwig, geb. Benz, in Offenburg/Baden geboren. Nach dem Besuch der Grundschule von 1967 - 1971 wechselte ich auf das Max-Planck-Gymnasium Lahr, wo ich 1980 das Abitur ablegte. Im Wintersemester 1980/81 begann ich mit dem Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München. Die Approbation als Tierärztin erhielt ich im Juni 1986. Im Sommer 1984 begann ich mit der Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch.

